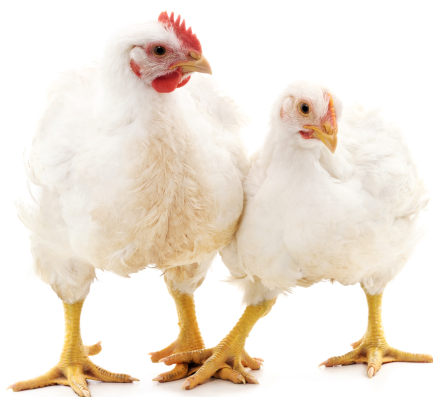


SARAH MOHRMANN

Experimentelle Untersuchungen zur Wirkung
von Methionin auf den antioxidativen
Status beim Broiler



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique 
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2019

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2019

© 2019 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. K. Eder

**Experimentelle Untersuchungen zur Wirkung
von Methionin auf den antioxidativen
Status beim Broiler**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Sarah Mohrmann

Tierärztin aus Sulingen

Gießen 2018

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Eder

2. Gutachter: Prof. Dr. C. Rummel

Prüfer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

Tag der Disputation: 18.12.2018

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Salzkotten, den 22.08.2018

Sarah Mohrmann

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	X
Abbildungsverzeichnis	XIII
Tabellenverzeichnis.....	XV
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Oxidativer Stress und antioxidative Mechanismen	2
2.1.1 Oxidativer Stress.....	2
2.1.2 Oxidantien und oxidative Schäden.....	3
2.1.3 Nrf2 und der Keap1-Nrf2-Signalweg	9
2.1.4 Nicht-enzymatische Antioxidantien	11
2.1.5 Enzymatische Antioxidantien	15
2.2 Methionin.....	19
2.2.1 Methionin in der Broilerfütterung	19
2.2.1 Methioninmetabolismus	21
3 Zielsetzung.....	27
4 Material und Methoden.....	30
4.1 Versuchstiere und Haltung	30
4.2 Fütterung	31
4.3 Datenerhebung der Leistung	35
4.4 Probengewinnung.....	36
4.5 Methoden der Laboranalytik	37
4.5.1 Probenvorbereitung	37
4.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	38
4.5.3 Bestimmung der Glutathionkonzentration	39
4.5.4 Bestimmung der Glutation-Peroxidase-Aktivität.....	43

Abkürzungsverzeichnis

4.5.5	Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität.....	46
4.5.6	Bestimmung der Katalase-Aktivität	48
4.5.7	Bestimmung der Proteincarbonyle	50
4.5.8	Bestimmung der Triglyceride	52
4.5.9	Bestimmung der Tocopherole	54
4.5.10	Bestimmung der TBA-RS.....	58
4.5.11	Genexpressionanalyse	60
4.6	Statistik.....	68
5	Ergebnisse	69
5.1	Leistungsdaten	69
5.1.1	Lebendmassen und Zunahmen	69
5.1.2	Futtermaufnahme und Futtermverwertung.....	70
5.2	Schlachtkörperdaten.....	73
5.3	Parameter des antioxidativen Status in Plasma und Geweben	77
5.3.1	Nicht-enzymatische Antioxidantien und Oxidationsprodukte	77
5.3.2	Antioxidative Enzyme.....	86
6	Diskussion	96
6.1	Einfluss der verschiedenen Methioninquellen und -konzentrationen auf die Leistungs- und Schlachtkörperdaten der Broiler	97
6.1.1	Einfluss auf die Leistungsparameter	97
6.1.2	Einfluss auf das Brustmuskelgewicht	100
6.1.3	Einfluss auf das Gewicht der Gewebe	102
6.2	Einfluss der verschiedenen Methioninquellen und -konzentrationen auf den antioxidativen Status der Broiler.....	104
6.2.1	Oxidationsprodukte	104
6.2.2	Nicht-enzymatische Antioxidantien	107
6.2.3	Antioxidative Enzyme.....	111
7	Fazit	115

Abkürzungsverzeichnis

8	Zusammenfassung	118
9	Summary	121
10	Literaturverzeichnis.....	123
11	Anhang	137
12	Danksagung	151

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
ACO	Acyl-CoA-Oxidase
Aqua bidest	Zweifach destilliertes Wasser
ARE	Antioxidative Response Elements
ATF	Activating Transcription Faktors
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	bicinchoninic acid
BHT	Butylhydroxytoluol
BSA	Bovines Serum Albumin
BTB	Broad complex, Tramtrack, Bric-à-brac
bZIP	Basic region and leucine zipper
Bzw	Beziehungsweise
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cu ²⁺ / Cu ¹⁺	Kupfer-Ionen
Cul3	Cullin 3
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat-behandeltes Aqua bidest
DGR	Double Glycine Repeat
DLM	DL-Methionin
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
e ⁻	Elektron
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EOH/Pyro	Ethanol-Pyrogallol-Gemisch
EpRE	Electrophile Response Elements
FA	Futteraufnahme
Fe ³⁺ / Fe ²⁺	Eisen-Ionen
FG	Fettgewebe
G	Gramm
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathion-Reduktase

Abkürzungsverzeichnis

GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST Ya	Glutathion-S-Transferase Ya
γ GCS	γ Glutamylcystein-Synthetase
H	Stunden
H ⁺	Wasserstoff-Ion
4-HNE	4-Hydroxynonenal
HO \cdot	Hydroxyl-Radikal
HO ⁻	Hydroxid-Ion
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIP	Hexan-Isopropanol-Gemisch (3:2)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
IVR	Intervening Region
kDa	Kilodalton
Keap1	Kelch-like ECH-Associating Protein 1
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
LM	Lebendmasse
Lsg	Lösung
mA	Milliampere
Maf	Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Proteins
MAT	Methionin-Adenosyl-Transferase
MDA	Malondialdehyd
MeOH	Methanol
Min	Minute/n
MHA	Methionin-Hydroxy-Analog
ml	Milliliter
ms	Millisekunde
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NaN ₃	Natriumazid

Abkürzungsverzeichnis

NaOH	Natriumhydroxid
Neh	Nrf2-ECH-Homology
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NQO1	NAD(P)H:quinone Oxidoreduktase 1
Nrf2	Nuclear faktor eryhroid 2-related factor 2
O ₂	molekularer Sauerstoff
O ₂ ^{•-}	Superoxid-Anion
PC	Proteincarbonyle
PCR	Polymerase chain reaction
Rbx1	Ringbox Protein 1
RNS	Reaktive Nitrogenspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Sek	Sekunde
SAA	sulfur amino acids (schwefelhaltige Aminosäuren)
SAH	S-Adenosylmethionin
SAM	S-Adenosylhomocystein
SD	Standardabweichung
SG	Schlachtgewicht
SOD	Superoxiddismutase
TBA	Thiobarbitursäure
TBA-RS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TCA	2,4,6-Trichloranisol
TG	Triglyceride
TM	Trockenmasse
TNB	2-Nitro-5-thiobenzoat
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies und antioxidative Mechanismen	4
Abbildung 2: Haber-Weiss-/ Fenton-Reaktion	4
Abbildung 3: Reaktive Sauerstoffspezies und ihre Auswirkungen	6
Abbildung 4: Prinzip der Genexpression durch Nrf2	11
Abbildung 5: Strukturformel von RRR- α -Tocopherol	13
Abbildung 6: Reaktion des Tocopherols mit einem Peroxylradikal	14
Abbildung 7: Strukturformel des Tripeptids Glutathion.....	14
Abbildung 8: SOD-katalysierte Umwandlung von O_2^- zu H_2O_2	17
Abbildung 9: Durch GPX katalysierte Reduktion von Peroxidverbindungen	19
Abbildung 10: Strukturformel des Methionins	21
Abbildung 11: Die Umwandlung von D-Methionin und DL-MHA zu L-Methionin	24
Abbildung 12: Methionin-Stoffwechsel.....	26
Abbildung 13: Broiler-Stall an Tag 21 (links) und Broiler am 35. Tag (rechts)	31
Abbildung 14: Prinzip der enzymatischen Messung von Glutathion	41
Abbildung 15: Beispielhafte Kalibrationsgerade zur Berechnung der Glutathionkonzentration	42
Abbildung 16: Prinzip der Messung der GPX-Aktivität.....	45
Abbildung 17: Formel zur Berechnung der Enzymaktivität von GPx	46
Abbildung 18: Prinzip von SOD als Katalysator von Sauerstoffradikalen	47
Abbildung 19: Prinzip von Katalase als Katalysator für Wasserstoffperoxid	49
Abbildung 20: Formel zur Berechnung der Katalase-Aktivität.....	50
Abbildung 21: Formel zur Berechnung der Triglyceridgehalte	53
Abbildung 22: Formel zur Berechnung der Tocopherolgehalte.....	57
Abbildung 23: Gewichtszunahme pro Tier (g) in der Grower-Phase Phase	140
Abbildung 24: Gewichtszunahme pro Tier (g) in der Finisher-Phase Phase	140
Abbildung 25: Gewichtszunahme pro Tier (g) in der gesamten Fütterungsperiode Phase.....	141
Abbildung 26: Endkörpergewichte pro Tier (g) nach der Finisher-Phase Phase	141
Abbildung 27: Gesamte Futteraufnahme pro Tier (g) nach der Starter-Phase	142
Abbildung 28: Futterverwertung nach der Starter-Phase.....	142
Abbildung 29: Futterverwertung nach der gesamten Fütterungsperiode Phase	143

Einleitung

Abbildung 30: Tocopherolkonzentrationen ($\mu\text{mol/g TG}$) in der Leber	144
Abbildung 31: Tocopherolkonzentrationen ($\mu\text{mol/g TG}$) in der Jejunummucosa nach der Finisher-Phase	145
Abbildung 32: PC-Konzentrationen (nmol/mg Protein) im Plasma nach der Finisher- Phase.....	145
Abbildung 33: Relative mRNA-Konzentration der SOD im Nierengewebe nach der Starter-Phase.....	146
Abbildung 34: Relative mRNA-Konzentration der GPx7 in der Jejunummucosa nach der Finisher-Phase.	146
Abbildung 35: Relative mRNA-Konzentration der GPx2 in der Jejunummucosa nach der Finisher-Phase.	147
Abbildung 36: SOD-Aktivität im Nierengewebe nach der Grower-Phase.	147
Abbildung 37: CAT-Aktivität im Nierengewebe nach der Grower-Phase.	148
Abbildung 38: SOD- (A) und CAT- Aktivität (B) in der Jejunummucosa nach der Starter-Phase.....	149
Abbildung 39: GPx-Aktivität in der Jejunummucosa nach der Grower-Phase.	150
Abbildung 40: CAT-Aktivität in der Jejunummucosa nach der Finisher-Phase.	150

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammensetzung der Futterrationen in g/kg ¹	33
Tabelle 2:	Nährstoffgehalte der Basisration.....	34
Tabelle 3:	Analysierte DLM- bzw. MHA-Konzentration (% der TM) in den Rationen der sieben Versuchsgruppen.....	35
Tabelle 4:	Materialien und Puffer zur Vorbereitung der Proben.....	38
Tabelle 5:	Nachverdünnung für die Proteinbestimmung.....	38
Tabelle 6:	Reagenzien und Geräte zur Bestimmung des Proteingehaltes	38
Tabelle 7:	Geräteeinstellungen für den Tecan infinite M200 für die Messung der Proteinkonzentration	39
Tabelle 8:	Nachverdünnung für die Glutathion-Messung.....	40
Tabelle 9:	Reagenzien, Puffer und Geräte für die Glutathion-Messung	40
Tabelle 10:	Pipettierschema für Proben und Standards zur Vorbereitung der Glutathion-Messung.....	42
Tabelle 11:	Pipettierschema für die Glutathion-Messung	43
Tabelle 12:	Nachverdünnung für die Messung der GPx-Aktivität	43
Tabelle 13:	Reagenzien, Puffer und Geräte zur Bestimmung der GPx-Aktivität...	44
Tabelle 14:	Pipettierschema zur Messung der GPx-Aktivität.....	45
Tabelle 15:	Reagenzien, Puffer und Geräte für die Bestimmung der SOD- Aktivität	47
Tabelle 16:	Geräteeinstellung des Tecan infinite M200 zur Messung der SOD- Aktivität	48
Tabelle 17:	Nachverdünnung für die Messung der Katalase-Aktivität	48
Tabelle 18:	Reagenzien und Geräte zur Bestimmung der Katalase-Aktivität	49
Tabelle 19:	Geräteeinstellungen des Tecan infinite M200 für die Messung der Katalase-Aktivität	50
Tabelle 20:	Kits, Puffer und Geräte für die Messung der Proteincarbonyle	51
Tabelle 21:	Geräteeinstellung des Tecan infinite M200 zur Messung der Proteincarbonyle	52
Tabelle 22:	Geräte und Reagenzien für die Bestimmung der Triglyceride	53
Tabelle 23:	Pipettierschema für die photometrische Messung der TG-Gehalte ...	54
Tabelle 24:	Geräte und Reagenzien für die Bestimmung der Tocopherolgehalte	55

Einleitung

Tabelle 25:	Pipettierschema zur Bestimmung der Tocopherolgehalte in den einzelnen Geweben	56
Tabelle 26:	Retentionszeiten, Kalibrationsbereiche und Wellenlängen für Tocopherole im HPLC.....	56
Tabelle 27:	Technische Daten und Einstellungen des HPLC zur Bestimmung der Tocopherolgehalte in Plasma, Leber, Niere und Jejunummucosa	57
Tabelle 28:	Reagenzien, Puffer und Geräte für die Messung der TBA-RS.....	58
Tabelle 29:	Pipettierschema zur Herstellung der Standards für die TBA-RS-Kalibrationsgerade	59
Tabelle 30:	Pipettierschema für die Messung der TBA-RS	60
Tabelle 31:	Geräteeinstellungen des Tecan infinite M200 für die Messung der TBA-RS.....	60
Tabelle 32:	Reagenzien, Puffer und Geräte für die Genexpression	62
Tabelle 33:	Zusammensetzung des Mastermix für die cDNA-Synthese.....	64
Tabelle 34:	Zusammensetzung des Mastermix für die qPCR.....	65
Tabelle 35:	Verwendete Primer und ihre Eigenschaften.....	66
Tabelle 36:	Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die Leistungsdaten in der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21), Finisher-Phase (Tag 22-35) und nach der gesamten Fütterungsperiode	71
Tabelle 37:	Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die Schlachtkörperdaten nach der Starter- (Tag 1-10), Grower-Phase (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35)	75
Tabelle 38:	Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die Konzentration von Tocopherol, Gluthation, TBA-RS und Proteincarbonylen im Plasma nach der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35).....	82
Tabelle 39:	Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die Konzentration von Glutathion, Tocopherol, TBA- RS und Proteincarbonyle im Lebergewebe nach der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35)....	83
Tabelle 40:	Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die Konzentration von Tocopherol im Nierengewebe	

Einleitung

	nach der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35)	84
Tabelle 41:	Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die Konzentration von Tocopherol und Glutathion in der Jejunummucosa nach der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35)	85
Tabelle 42:	Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die relative mRNA- Konzentration der Zielgene im Lebergewebe nach der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35)	88
Tabelle 43:	Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die relative mRNA- Konzentration der Zielgene im Nierengewebe nach der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35)	89
Tabelle 44:	Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die relative mRNA- Konzentration der Zielgene in der Jejunummucosa nach der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35)	90
Tabelle 45:	Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die Aktivität der enzymatischen Enzyme im Lebergewebe nach der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35)	93
Tabelle 46:	Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die Aktivität der enzymatischen Enzyme im Nierengewebe nach der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35)	94
Tabelle 47:	Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die Aktivität der enzymatischen Enzyme in der Jejunummucosa nach der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35)	95
Tabelle 48:	Nährstoffgehalte der Vormischung Premix. Identisch für Starter, Grower und Finisher (nach MIAVIT GmbH, 2013) ¹	137

Einleitung

Tabelle 49:	Auswirkungen der Fütterung von DLM und MHA mit je drei verschiedenen Methioninzulagen auf die Leistungsdaten in der gesamten Fütterungsperiode und 3 Versuchsdurchgängen	138
Tabelle 50:	Auswirkungen der Fütterung von DLM und MHA mit je drei verschiedenen Methioninzulagen auf die Schlachtkörperdaten in der gesamten Fütterungsperiode und 3 Versuchsdurchgängen	139

1 Einleitung

Der oxidative Stress bezeichnet eine Stoffwechsellage im Organismus, die durch sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) hervorgerufen wird und zu vielfältigen Schädigungen führen kann. Unterschiedliche Faktoren, wie zum Beispiel Fütterung, Krankheiten, Umwelteinflüsse oder ein verhaltensbedingter, erhöhter Metabolismus, können der Grund für eine vermehrte Bildung von ROS sein. Kann das natürliche antioxidative System der Tiere diesem ROS-Anstieg nicht mehr entgegensteuern, kommt es zum oxidativen Stress und folglich zur Schädigungen von Lipiden, Proteinen, Kohlenhydraten und DNA (Sies 1997). Bezogen auf die Broilermast resultiert diese Schädigung vor allem in der Beeinträchtigung der Gesundheit, Leistung und Fleischqualität. In der intensiven kommerziellen Geflügelproduktion können verschlechterte Produktionsleistungen schnell zu hohen wirtschaftlichen Schäden führen. Daher ist das Ziel, insbesondere aus fütterungstechnischer Sicht, das Risiko für den oxidativen Stress so gering wie möglich zu halten.

Ein Fütterungsaspekt ist die Supplementierung von Methionin. Methionin ist die erstlimitierende Aminosäure beim Geflügel und übernimmt zahlreiche wichtige Funktionen im Organismus. Eine besondere Bedeutung nimmt Methionin vor allem als Vorstufe des Antioxidans Glutathion ein, welches eine wichtige Rolle in der Abwehr von ROS spielt (Bunchasak 2009, Swennen et al. 2011). In der kommerziellen Broilermast werden vor allem die beiden Produkte *DL- Methionin* (DLM) und die *DL-2-hydroxy-4-Methylthiobuttersäure* (DL-HMTBA) (im Weiteren als Methionin-Hydroxy-Analog (MHA) bezeichnet) eingesetzt.

Beide Methioninquellen wurden in vorangegangenen Arbeiten bereits hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Leistung und der Bioeffizienz untersucht und verglichen. Über die Auswirkung des DLM und MHA auf das antioxidative System des Broilers ist bis jetzt jedoch wenig bekannt.

In der folgenden Literaturübersicht werden die Themen „oxidativer Stress“ und „Methionin“ detailliert dargestellt.

2 Literaturübersicht

2.1 Oxidativer Stress und antioxidative Mechanismen

2.1.1 Oxidativer Stress

Ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zu Gunsten der Oxidantien, welches potentiell zu Schäden führen kann, wird als *Oxidativer Stress* bezeichnet. Oxidantien sind normale Produkte des aeroben Stoffwechsels, können jedoch unter pathophysiologischen Vorgängen vermehrt produziert werden (Sies 1997). Verschiedene Zellkomponenten können durch die Anreicherung dieser giftigen, oxidierten Verbindungen geschädigt werden (Birben et al. 2012).

Um die Konzentration der Oxidantien zu kontrollieren, besitzt der Körper ein komplexes System aus enzymatischen und nicht-enzymatischen Antioxidantien (Sies 1997). Zusätzlich wird hierfür eine Reihe von Enzymen benötigt, die die Antioxidantien in ihre aktive Form zurückführen (Blokchina et al. 2003). Die Glutathion- Reduktase (GR) beispielsweise kann oxidiertes Glutathion (GSSG) in einer NADPH- abhängigen Reaktion wieder zu reduziertem Glutathion (GSH) regenerieren (Grant 2001). Eine Störung der Balance zwischen Oxidantien und Antioxidantien kann verschiedene Gründe haben. Zum einen kann ein erhöhter Gehalt an exogenen oder endogenen Verbindungen zu einer Autooxidation und somit zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen. Zu den endogenen Quellen der Oxidantien zählt primär die physiologische Entstehung von Superoxid- Anionen in der Atmungskette in den Mitochondrien. Die exogenen Quellen der ROS sind vor allem pathologische Entzündungsprozesse und werden z.B. durch Strahlung, Toxine oder das Rauchen beim Menschen hervorgerufen (Lykkesfeldt & Svendsen 2007). Zum anderen können ein Abbau von Reserven der nicht-enzymatischen Antioxidantien, eine Inaktivierung antioxidativer Enzyme oder eine verminderte Produktion der Antioxidantien ursächlich für ein weniger aktives antioxidatives System sein (Lushchak 2014). Der chronische oxidative Stress spielt laut Birben et al. (2012), Mamelak (2007) und Lushchak (2014) bei der Entstehung einiger akuter oder chronischer Erkrankungen, wie z.B. Entzündungen, Mikroangiopathien und wahrscheinlich auch Alzheimer, sowie Krebs, Diabetes mellitus und auch bei der Alterung (Sanz 2016) eine Rolle.

Anders als Sies (1997) definiert Jones (2006) den oxidativen Stress als eine Störung der Redox-Signalwege und deren Kontrolle. Diese Aussage basiert auf einigen neueren Studien, die beschreiben, dass die ROS nicht nur oxidativen Stress induzieren, sondern auch eine wichtige Funktion in der Regulierung intrazellulärer Signalwege, sowie der Regulierung von Zellwachstum und Differenzierung übernehmen (Finkel 2011; Schieber & Chandel 2014; Herrmann et al. 2015).

Laut Lushchak (2014) gibt es zurzeit keine akzeptierte Klassifizierung des oxidativen Stresses. Er unterteilt den oxidativen Stress in die Kategorien basal (BOS), wenig stark (LOS), mittel stark (IOS) und sehr stark (HOS). Im Folgenden werden das oxidative und das antioxidative System näher erläutert.

2.1.2 Oxidantien und oxidative Schäden

Oxidantien sind die sogenannten ROS und reaktiven Nitrogenspezies (RNS) (Lushchak 2014; Pisoschi & Pop 2015). Zu den ROS gehören vor allem das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxyl-Radikal ($HO\cdot$) (Lushchak 2014). Ihre Entstehung wird in Abbildung 1 dargestellt. Das $O_2^{\cdot-}$ entsteht durch die Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff. Diese Reaktion findet vor allem in den Mitochondrien während der Atmungskette statt oder wird durch die Enzyme NADPH- Oxidase oder Xanthinoxidase in Leukozyten, Monozyten und Makrophagen katalysiert. $O_2^{\cdot-}$ wird anschließend durch die Aktivität der Superoxiddismutase (SOD) in H_2O_2 umgewandelt. H_2O_2 kann ebenso durch Xanthinoxidase, NADPH- Oxidase, Aminosäureoxidase und in Peroxisomen durch den Verbrauch von molekularem Sauerstoff in Stoffwechselreaktionen entstehen. H_2O_2 kann einerseits enzymatisch durch die Katalase (CAT) und die Glutathionperoxidase (GPx) direkt zu H_2O umgesetzt werden (Lushchak 2014). Andererseits kann H_2O_2 in einer Abfolge von Reaktionen, die als *Haber- Weiss-/ Fenton-Reaktionen* bekannt sind, zusammen mit $O_2^{\cdot-}$ und in Anwesenheit von Übergangsmetallionen wie Eisen (Fe^{2+}) oder Kupfer (Cu^{2+}) zu einem Hydroxid-Ion (OH^-) und einem Hydroxylradikal ($OH\cdot$) reagieren (Abbildung 2). $OH\cdot$ ist das reaktivste aller ROS und führt über Kettenreaktionen zu zahlreichen Schädigungen, wie z.B. Lipidperoxidation. Diese Kettenreaktionen können durch Antioxidantien, wie z.B. Tocopherol, unterbrochen werden (Birben et al. 2012; Miller et al. 1993).

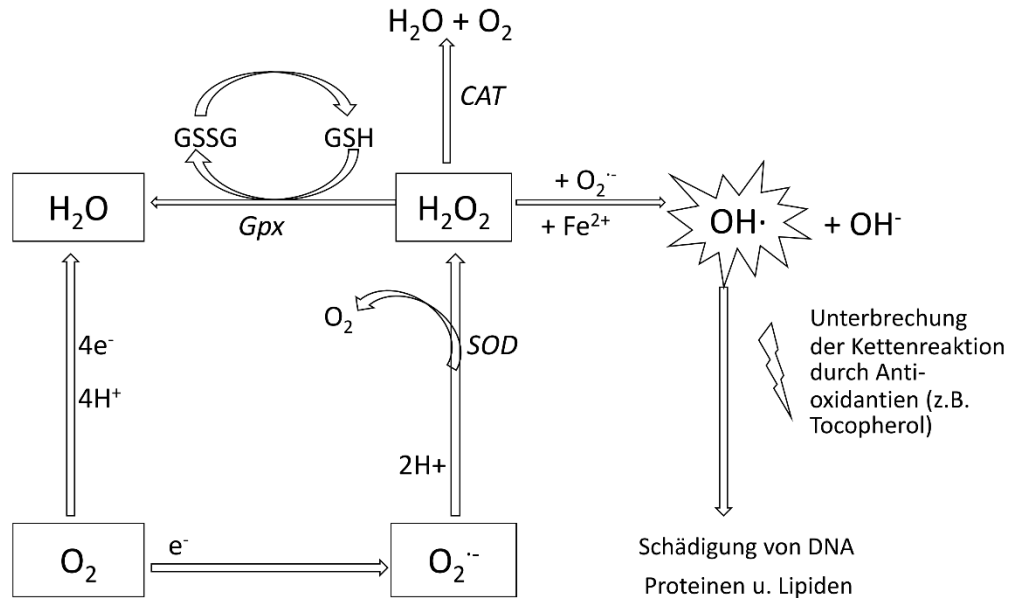


Abbildung 1: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies und antioxidative Mechanismen. Aus molekularem Sauerstoff (O_2) entsteht durch die Aufnahme eines Elektrons (e^-) ein Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$). $O_2^{\cdot-}$ wird durch die Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und O_2 abgebaut. H_2O_2 kann durch Katalase (CAT) zu Wasser (H_2O) und O_2 oder durch Glutathionperoxidase (GPx) unter Glutathion (GSH)-Verbrauch zu H_2O umgesetzt werden. Andererseits ist auch die Reaktion mit $O_2^{\cdot-}$ und einem Übergangsmetall-Ion (Fe^{3+}) zu einem Hydroxylradikal ($OH\cdot$) und einem Hydroxidion (OH^-) möglich. $OH\cdot$ initiiert Kettenreaktionen, die zu schweren zellulären Schädigungen im Organismus führen. Diese können durch Antioxidantien wie z.B. Tocopherol unterbrochen werden. Schema in Anlehnung an Birben et al. (2012) und Lushchak (2014)

Haber-Weiss-Reaktion: $Fe^{3+} + O_2^{\cdot-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$

Fenton-Reaktion: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH\cdot$

Abbildung 2: Haber-Weiss-/ Fenton-Reaktion. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) kann zusammen mit einem Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$) in Anwesenheit von Übergangsmetallionen (z.B. Eisen (Fe)) zu einem Hydroxid-Ion (OH^-) und einem Hydroxylradikal ($OH\cdot$) reagieren

Literaturübersicht

Zu den radikalen Sauerstoffspezies zählen neben $O_2^{\cdot-}$ und HO^{\cdot} auch Peroxylradikale (RO_2^{\cdot}), Alkoxylradikale (RO^{\cdot}) und Hydroperoxyl-Radikale (HO_2^{\cdot}). Zu den nicht-radikalen Sauerstoffspezies gehören neben H_2O_2 auch Ozon (O_3), Singulett-Sauerstoff (1O_2), Hydroperoxid ($ROOH$) und Hypochlore Säure ($HOCl$) (Lushchak 2014; Traber & Sies 1996). Dies sind chemisch reaktive Verbindungen, die aus molekularem Sauerstoff im aeroben Stoffwechsel entstehen (Schieber & Chandel 2014; Höhn et al. 2013). Lushchak (2014) beschreibt, dass mehr als 90% des Sauerstoffs im Organismus unter aeroben Bedingungen durch die Cytochromoxidase in der Elektronen-Transportkette mit der Übertragung von vier Elektronen direkt zu Wasser reduziert wird, ohne dass ROS gebildet werden. Weniger als 10% des Sauerstoffs wird zu $O_2^{\cdot-}$ und in weiteren enzymatischen Schritten zu H_2O_2 reduziert. Nur in Ausnahmefällen, wie z.B. einer Eisenüberladung, kann es auch zur Entstehung des sehr reaktiven OH^{\cdot} kommen. Laut Birben et al. (2012) produzieren sogar nur 1-3% der gesamten Elektronen Superoxide. Die ROS entstehen vor allem während normaler zellulärer Aktivität in den Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung (Freeman & Crapo 1982), bei der Zerstörung von Bakterien oder Viren durch phagozytierende Zellen (oxidativer Burst) (Colton & Gilbert 1987) und weiteren zellulären Reaktionsschritten. Hierzu gehören eine Reihe von enzymatischen Reaktionen der Lipxygenase, Peroxidase, NADPH-Oxidase und auch der Xanthinoxidase (Blokina et al. 2003). Außerdem werden ROS vermehrt durch exogene Faktoren gebildet. Dazu zählen z.B. UV- und Röntgen-Strahlung, Ultraschall, Nanopartikel, Pestizide, Schwermetallionen und Hypoxie (Höhn et al. 2013).

Sind die ROS in überhöhter Menge vorhanden, so dass das antioxidative System des Körpers diese nicht mehr neutralisieren kann, kommt es zur Schädigung von Makromolekülen (Celi & Gabai 2015) (Abbildung 3). Hauptsächlich betroffen sind Lipide, Proteine, Kohlenhydrate und Nukleinsäuren.

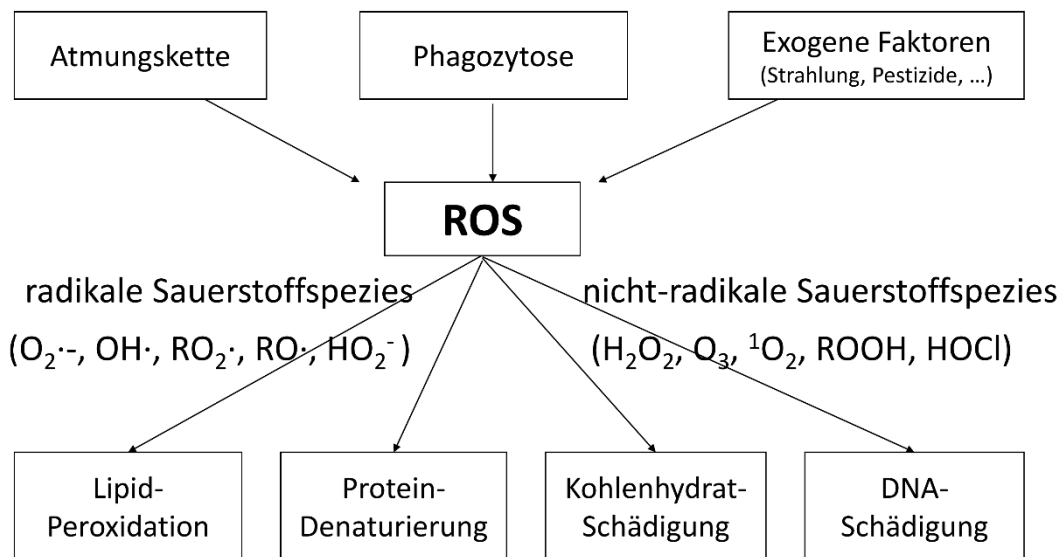


Abbildung 3: Reaktive Sauerstoffspezies und ihre Auswirkungen. ROS werden in der Atmungskette, durch Phagozytose und exogene Faktoren gebildet und können zur Schädigung von Lipiden, Proteinen, Kohlenhydraten und DNA führen. Zu den ROS gehören die radikalen Sauerstoffspezies $O_2^{\cdot-}$ (Superoxid-Anion), OH^{\cdot} (Hydroxylradikal), RO_2^{\cdot} (Peroxylradikal), RO^{\cdot} (Alkoxylradikal) und HO_2^{\cdot} (Hydroperoxylradikal), sowie die nicht-radikalen Sauerstoffspezies H_2O_2 (Wasserstoffperoxid), O_3 (Ozon), 1O_2 (Singulett-Sauerstoff), $ROOH$ (Hydroperoxid) und $HOCl$ (Hypochlore Säure). Schema in Anlehnung an Celi & Gabai (2015)

Sauerstoffradikale können Fette, Proteine, Polysaccharide, DNA und andere Makromoleküle angreifen und schädigen. Die Moleküle oxidieren durch die initiale Aufnahme von Elektronen aus anderen Molekülen und eine daraus entstehende Kettenreaktion. Ist diese Reaktion unkontrolliert, führt dies zu massiven Gewebeschäden. Die Membranpermeabilität, Enzymaktivitäten oder auch der Muskeltonus können betroffen sein (Miller et al. 1993). Durch die Oxidation der Makromoleküle entstehen Endprodukte, die gemessen werden können, um die Ausmaße des oxidativen Stresses zu bewerten (Celi & Gabai 2015).

2.1.2.1 Oxidative Schädigung von Nukleinsäuren

Die oxidative Schädigung der DNA kann durch ionisierte Strahlung oder Photooxidation (z.B. UV-Licht), Wasserstoffperoxid, Sauerstoffradikale oder zahlreiche andere oxidierende Stoffe hervorgerufen werden. Diese Faktoren können

unter anderem zu Doppel- oder Einzelstrangbrüchen, Chromosomenbrüchen, oxidierten Basen oder Thymin-Dimeren führen. Die Reparatur dieser entstandenen Schäden erfolgt enzymatisch durch unterschiedliche Mechanismen. Dabei spielen Enzyme wie Endonukleasen, DNA-Polymerasen oder DNA-Glycosylasen eine Rolle (Sies 1986).

2.1.2.2 Oxidative Schädigung von Aminosäuren und Proteinen

Proteine sind die Moleküle, die am anfälligsten gegenüber oxidativen Schäden sind, da sie neben Wasser die Hauptkomponente vieler biologischer Systeme darstellen (Davies 2016; Celi & Gabai 2015). Neben Proteinen können ebenso Peptide und Aminosäuren durch ROS geschädigt werden (Davies 2016). ROS (radikale und nichtradikale Spezies), sowie auch die sekundären Nebenprodukte des oxidativen Stresses (z.B. Lipidperoxide), können zur Proteinoxidation führen (Celi & Gabai 2015; Berlett & Stadtman 1997). Da Proteine eine Vielzahl wichtiger und einzigartiger Funktionen im Organismus übernehmen, können die Proteinoxidation und die daraus resultierenden Strukturumwandlungen zum Verlust bzw. zur Änderung dieser Funktionen führen. Dazu zählen die Funktionen als Enzyme, Rezeptoren, Transport- oder Strukturproteine. Durch die ROS kann entweder der Hauptstrang oder die Seitenketten der Proteine oxidiert werden. Während die Fragmentierung des Hauptstranges als Marker des oxidativen Stresses ungeeignet ist, sind die Produkte der Seitenkettenoxidation (insbesondere die Carbonylgruppen) stabil genug, um sie als Biomarker zuverlässig messen zu können. Proteincarbonyle (PC) entstehen, wenn ROS die Aminosäure-Seitenketten von Prolin, Arginin, Lysin und Threonin unter Anwesenheit der Übergangsmetalle Eisen oder Kupfer angreifen (Celi & Gabai 2015).

2.1.2.3 Oxidative Schädigung von Kohlenhydraten

Polysaccharide wie z.B. Hyaluronsäure können durch oxidative Schädigung zerstört werden. SOD ist in diesem Fall fähig die Hyaluronsäure vor der Depolymerisation zu schützen (Sies 1986). Die Hyaluronsäure spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Synovialflüssigkeit der Gelenke. Ist die Hyaluronsäure durch ROS geschädigt führt dies zu einer pathologischen Verringerung der synovialen Viskosität und folglich zu Gelenksschädigungen wie Arthrose (Necas et al. 2008).

2.1.2.4 Oxidative Schädigung von Fetten

Die spezifische, enzymatische Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren sollte laut Sies (1986) nicht als schädigender Prozess angesehen werden, da sie Bestandteil wichtiger biologischer Signalwege ist. Aus Fettsäuren, die vor allem in biologischen Membranen als Phospholipide vorkommen, wird unter Aktivität der Phospholipase A Arachidonsäure gebildet. Anschließend erfolgt eine Oxidation der Arachidonsäure, die durch Enzyme wie Cyclooxygenase und Lipoxigenase katalysiert wird und bei der, Produkte wie Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene entstehen.

Neben der spezifischen Oxidation gibt es auch die unspezifische Oxidation der Fettsäuren, die auch als Lipidperoxidation bekannt ist. Diese Lipidperoxidation wird durch Radikale initiiert (Sies 1986; Ayala et al. 2014). Die beiden ROS, die Lipide am schwerwiegendsten schädigen, sind das Hydroxyl-Radikal ($\text{HO}\cdot$) und das Hydroperoxyl-Radikal ($\text{HOO}\cdot$). In einer ersten Startreaktion wird ein Wasserstoffatom durch ein Peroxyl- oder Alkoxyl- Radikal von der Fettsäure abgespalten und es entsteht ein Fettsäureradikal. Dieses reagiert in der Folgereaktion mit O_2 zu einem Lipidperoxyl-Radikal ($\text{LOO}\cdot$) und dieses wiederum mit einer ungesättigten Fettsäure zu einem weiteren Fettsäureradikal und einem Lipidhydroperoxid. In der Abbruchreaktion geben Antioxidantien wie Vitamin E ein Wasserstoffatom an das $\text{LOO}\cdot$ ab. Das dabei entstehende Vitamin E-Radikal reagiert mit einem weiteren $\text{LOO}\cdot$ und bildet ein nicht- radikales Produkt. Die Kettenreaktionen im zweiten Schritt werden dabei solange fortgeführt bis ein Abbruchprodukt entsteht (Ayala et al. 2014; Yin et al. 2011). Bei der Lipidperoxidation entstehen neben dem Lipidhydroperoxid weitere Produkte wie z.B. Malondialdehyde (MDA), Propanal, Hexanal und 4-Hydroxynonenal (4-HNE). Beide spielen in pathologischen Prozessen wie Krebs, Diabetes, Alzheimer oder kardiovaskulären Erkrankungen eine Rolle (Ayala et al. 2014). Die Produkte der Lipidperoxidation werden zum Teil auch Thiobarbitursäure reaktive Substanzen (TBA- RS) genannt. MDA beispielsweise kann mit TBA reagieren und einen farbigen Komplex bilden, der photometrisch messbar ist (Ayala et al. 2014). Um Rückschlüsse auf das Ausmaß der oxidativen Schädigung ziehen zu können, wurden die TBA- RS in dieser Arbeit gemessen.

2.1.3 Nrf2 und der Keap1-Nrf2-Signalweg

Die ersten Auswirkungen des oxidativen Stresses führen zur Aktivierung einer Vielzahl von Abwehr-Genen, welche wiederum zum Schutz der Zelle vor ROS dienen. Diese Gene tragen zum einen die Informationen zur Bildung von Enzymen, wie die *NAD(P)H:quinone Oxidoreduktase 1* (NQO1), die Glutathion- S- Transferase Ya (GST Ya), γ - Glutamylcystein- Synthetase (γ GCS) und die GPx, zum anderen gibt es Abwehr-Gene, deren Endprodukte vielfältige Zellaktivitäten wie Signaltransduktion, Proliferation und immunologische Abwehrreaktionen regulieren. Transkriptionsfaktoren wie der *Nuclear factor erythroid 2- related factor 2* (Nrf2) und der *Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) stehen mit der Expression dieser Gene in Zusammenhang (Kaspar et al. 2009; Kim et al. 2010).

Der Nrf2 gilt dabei zusammen mit seinem Signalweg als der bedeutendste in der zellulären antioxidativen Abwehr (Kaspar et al. 2009; Kansanen et al. 2013) (Abbildung 4). Der Nrf2 ist ein *basic region leucine zipper*- Transkriptionsfaktor und gehört zur *Cap'n'Collar*-(CNC-)Familie, zu der auch NF-E2, Nrf1, Nrf3, Bach1 und Bach2 gehören (Tkachev et al. 2011; Ma 2013; Baird & Dinkova-Kostova 2011). Sie alle binden an eine spezifische Promotorregion zytoprotektiver Gene, die als *Antioxidative Response Elements* (ARE) oder auch *Electrophile Response Elements* (EpRE) bezeichnet werden (Baird & Dinkova-Kostova 2011; Tkachev et al. 2011; Kaspar et al. 2009). Als Antwort auf verschiedene Stimuli wie Oxidantien, Xenobiotika, Metalle oder UV- Strahlung werden redoxsensitive Transkriptionsfaktoren aktiviert und daraufhin ARE- vermittelte antioxidative und andere zytoprotektive Gene hochreguliert (Baird & Dinkova-Kostova 2011; Kaspar et al. 2009).

Das Nrf2-Protein besteht aus 605 Aminosäuren, die die 6 funktionellen *Nrf2-ECH-Homology*-Untereinheiten (Neh1- 6) bilden. Neh1 enthält die *basic region and leucine zipper* (bZIP)-Domäne, die für die Dimerisierung und Bindung am ARE zuständig ist. Die Domänen Neh3, Neh4 und Neh5 binden an verschiedene Koaktivatoren. Neh2 und Neh6 sind Funktionseinheiten der Redox-abhängigen Regulation der Proteinstabilität und außerdem erfolgt über Neh2 die Bindung zum *Kelch-like ECH-Associating Protein1* (Keap1) (Baird & Dinkova-Kostova 2011; Tkachev et al. 2011).

Unter basalen Bedingungen ist Nrf2 im Zytoplasma an das Inhibitorprotein Keap1 gebunden. Keap1 besteht aus den Untereinheiten *Broad complex*, *Tramtrack*, *Bric-à-*

brac (BTB)-Domäne, einer Cystein-reichen *Intervening Region* (IVR)-Domäne und einer *Double Glycine Repeat; Kelch Repeat* (DGR)-Domäne. Während die DGR-Domäne das Keap1 mit dem Neh2 des Nrf2 und auch dem Zytoskelett der Zelle verbindet, ist die Aufgabe der BTB- Domäne die Homodimerisierung und die Bindung des Keap1 zum *Cullin3/ Ringbox Protein1* (Cul3/Rbx1)-E3-Ubiquitinligase-Komplex. Im unstimulierten Zustand wird das Nrf2 ubiquitiniert und kontinuierlich durch die 26S-Proteasomen abgebaut (Kaspar et al. 2009; Kobayashi et al. 2004; Baird & Dinkova-Kostova 2011; Tkachev et al. 2011; Nguyen et al. 2009) (Abbildung 4).

Wird die Zelle durch ROS stimuliert, werden die reaktiven Cysteinreste in der IVR-Domäne des Keap1 oxidiert und es entstehen intramolekulare Disulfidbrücken. Durch diese Änderung der dreidimensionalen Struktur gibt Keap1 das Nrf2-Molekül frei und dieses kann in den Zellkern wandern (Baird & Dinkova-Kostova 2011; Kim et al. 2010; Ma 2013). Im Zellkern bildet Nrf2 mit anderen bZIP- Proteinen, wie den kleinen Maf-Proteinen (MafG, MafK, MafF und MafT), ein Heterodimer, welches an das ARE bindet und die Transkription der Zielgene veranlasst (Kaspar et al. 2009; Ma 2013). Neben den kleinen Mafs können auch andere Transkriptionsfaktoren wie *Jun* (Jun-D, c-Jun, Jun-B) oder die *Activating Transcription Faktors* (ATF1, ATF2, ATF3, ATF4) ein Heterodimer mit Nrf2 bilden und an ARE binden (Baird & Dinkova-Kostova 2011; Kaspar et al. 2009) (Abbildung 4).

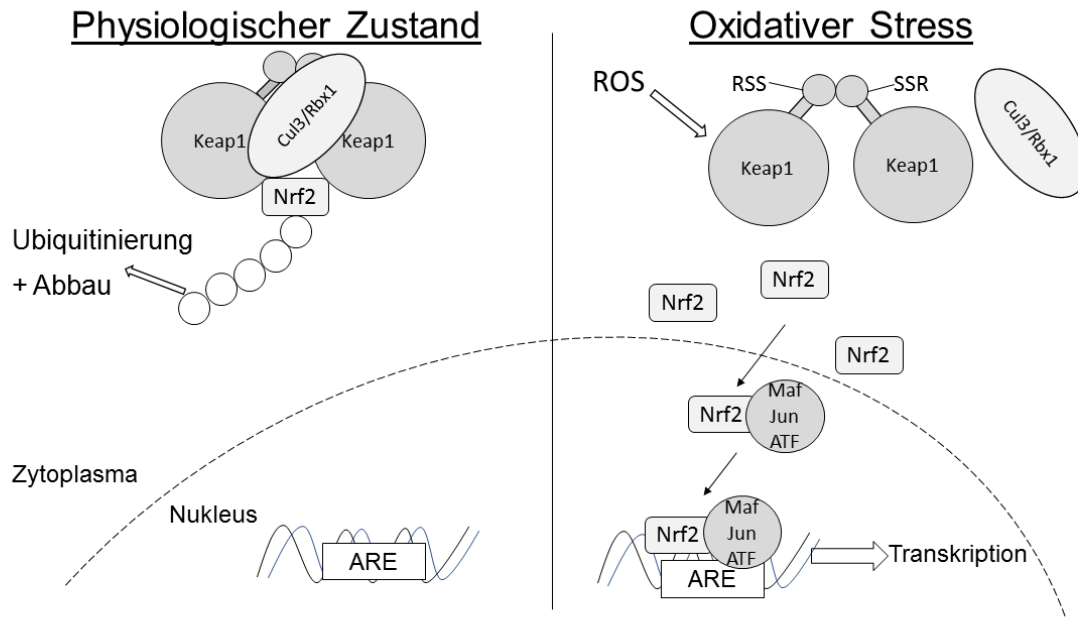


Abbildung 4: Prinzip der Genexpression durch Nrf2. Unter physiologischen Bedingungen ist Nrf2 an das Inhibitorprotein Keap1 und den daran anschließenden Cul3/Rbx1-E3-Ubiquitinligase-Komplex gebunden. Das Nrf2 wird ubiquitiniert und abgebaut. Befindet sich die Zelle im Status des oxidativen Stresses, wird Keap1 durch den Einfluss von ROS in seinen Cysteinresten verändert (-RSS: Disulfidbrücken) und gibt den zuvor gebundenen Nrf2 frei. Dieser wandert in den Zellkern, dimerisiert mit anderen bZIP-Proteinen (Maf, Jun, ATF) und bindet als Heterodimer an die Promotorregion ARE. Dort erfolgt die Transkription der Zielgene. Abkürzungen: ARE: Antioxidative Response Elements; ATF: Activating Transcription Factors; Cul3: Cullin 3; Jun: Transkriptionsfaktor Jun; Keap1: Kelch-like ECH-Associating Protein 1; Maf: kleine Maf-Proteine (small Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Proteins); Nrf2: Nuclear factor erythroid 2- related factor 2; Rbx1: Ringbox Protein 1; ROS: Reaktive Sauerstoffspezies. Schema in Anlehnung an Tkachev et al. (2011) und Baird & Dinkova-Kostova (2011)

2.1.4 Nicht-enzymatische Antioxidantien

Die Hauptaufgabe der nicht-enzymatischen Antioxidantien besteht darin, reaktive Spezies abzufangen, um schädigende Reaktionen an biologischen Membranen zu verhindern. Das Ziel dieses Deaktivierungs-Prozesses ist die Bildung von nicht-radikalen und nicht-reaktiven Endprodukten (Sies 1997). Zu den wichtigsten nicht-enzymatischen Antioxidantien zählen die wasserlöslichen Vitamin C (Ascorbat), Harnsäure und Glutathion, sowie die fettlöslichen Vitamin E (Tocopherol) und β -Carotin. Sie werden auch als Antioxidantien mit niedriger Molekularmasse bezeichnet, da ihr Molekulargewicht normalerweise unter 1 kDa liegt (Lushchak 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde der Gehalt des Tocopherols und des Glutathions in

verschiedenen Geweben gemessen. Aus diesem Grund werden unter anderem diese Antioxidantien im Folgenden näher dargestellt.

2.1.4.1 β -Carotin

In der Literatur sind über 550 natürlich vorkommende Carotinoide beschrieben, die aufgrund ihrer Fettlöslichkeit zu über 80% im Fettgewebe vorliegen. Etwa 50 Carotinoide fungieren als Provitamin A, wobei β -Carotin die größte Aktivität hat. Durch freie Diffusion wird ein Teil des β -Carotins aus dem Dünndarm resorbiert und kann dann enzymatisch zu Vitamin A (Retinol) umgewandelt werden (Sies 1990). Genau wie andere antioxidative Vitamine auch, hat das β -Carotin die Eigenschaft Elektronen abzugeben oder die Energie von angeregten Elektronen aufzunehmen (Metz 1995). Die antioxidative Funktion der Carotinoide bezieht sich vor allem auf die Unschädlichmachung von Singuletsauerstoff ($^1\text{O}_2$), die elektronisch angeregte Form des Sauerstoffes. Carotinoidmoleküle fangen den sehr aggressiven $^1\text{O}_2$ ab, indem sie diesen oxidieren und anschließend isomerisieren, wodurch molekularer Sauerstoff (O_2) entsteht (Sies 1990; Gammone et al. 2015). Der entstandene Triplettzustand des Carotinoids hat wiederum die Eigenschaft die aufgenommene Energie in Form von Wärme abzugeben und in seinen Grundzustand zurückzukehren. Teilweise gehen jedoch auch Carotinoide bei dieser Reaktion verloren (Sies 1990). Der antioxidative Schutzmechanismus des β -Carotin beinhaltet neben dem Abfangen des $^1\text{O}_2$ ebenso die Unschädlichmachung freier Radikale (Gammone et al. 2015).

2.1.4.2 Tocopherol

Die Tocopherole gehören zu einer Gruppe von acht strukturähnlichen Stoffen, die in ihrer Gesamtheit als Vitamin E bezeichnet werden. Zu ihnen gehören α -, β -, γ - und δ -Tocopherol sowie α -, β -, γ - und δ -Tocotrienole und sie alle werden ausschließlich in Pflanzen synthetisiert. Sie müssen also über die Nahrung aufgenommen werden. Tocopherole besitzen eine Methylgruppe am hydroxylierten Chromanring und eine gesättigte Phytol-Seitenkette, durch die sie optimal in den Lipidmembranen verankert werden können (Sies 1997) (Abbildung 5).

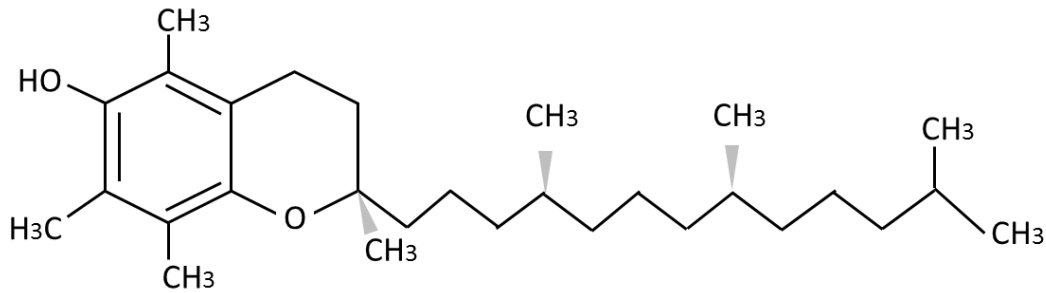


Abbildung 5: Strukturformel von RRR- α -Tocopherol

Die biologisch aktivste Form der Tocopherole ist das RRR- α - Tocopherol (Blokina et al. 2003; Traber & Sies 1996). Dies liegt zum einen daran, dass die nicht- α - Tocopherole bereits im Leberstoffwechsel vermehrt abgebaut werden. Zum anderen ist das α - Tocopherol- Transfer- Protein (TTP) verantwortlich für den Transport der Tocopherole in den Blutkreislauf. Durch seine hohe Bindungsaffinität zu α - Tocopherol beeinflusst das TTP dessen hohe Aktivität positiv (Greibenstein et al. 2014; Traber & Atkinson 2007). Das Tocopherol ist ein fettlösliches, kettenbrechendes Antioxidans, das als Radikalfänger vor allem mehrfach ungesättigte Fettsäuren in Membranlipiden und in Plasmalipoproteinen vor der Lipidperoxidation schützt. Das heißt, es ist in der Lage oxidierende Radikale direkt zu hemmen und somit die Kettenreaktion der Lipidautooxidation zu unterdrücken (Azzi 2007). Die Hydroxylgruppe des Tocopherols reagiert dabei mit einem Peroxylradikal, wobei ein Tocopherol-Radikal und Hydroperoxid entsteht (Abbildung 6). Das entstandene Hydroperoxid wird durch weitere nicht- radikale Reaktionen unschädlich gemacht, während das Tocopherol-Radikal durch einen Wasserstoff-Donor wieder zu Tocopherol reduziert wird. Diese Reduktion erfolgt zum Beispiel durch Vitamin C oder reduziertes Glutathion (Traber & Sies 1996; Blokina et al. 2003).

Neuere Studien vermuten, dass eine wesentliche Aufgabe des Tocopherols darin liegt, oxidative Schäden an der Lipidmembran zu erkennen und daraufhin eine zelluläre Antwort einzuleiten (Brigelius-Flohé 2009). Außerdem sind besonders beim α - Tocopherol weitere strukturspezifische Funktionen bei spezifischen Enzymaktivitäten und als Membranbestandteil beschrieben. Verschiedene Studien zeigen den Einfluss des α -Tocopherols auf die Regulation der Zellproliferation glatter Muskelzellen und der Proteinkinase C-Aktivität sowie auf die Unterdrückung des

Arachidonsäuremetabolismus durch Phospholipase-Hemmung (Traber & Sies 1996). Brigelius-Flohé (2009) beschreibt zudem, dass Vitamin E die Genaktivität von Proteinen, die mit Apoptose, Zellwachstum, Entzündungen, Metabolismus oder anderen Prozessen des Organismus in Zusammenhang stehen, regulieren kann.

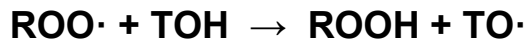


Abbildung 6: Reaktion des Tocopherols mit einem Peroxylradikal. Die Hydroxylgruppe des Tocopherols (TOH) reagiert mit einem Peroxylradikal ($\text{ROO}\cdot$). Es entsteht ein Tocopherolradikal ($\text{TO}\cdot$) und Hydroperoxid (ROOH)

2.1.4.3 Glutathion

Das Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-Cysteinylglycine) ist ein Tripeptid, das aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin besteht (Abbildung 7). Glutathion (GSH) wird intrazellulär durch zwei aufeinander folgende, ATP-verbrauchende Reaktionen synthetisiert. Zuerst wird γ -Glutamylcystein aus Glutaminsäure und Cystein unter Aktivität der γ -Glutamylcystein-Synthetase gebildet. Im zweiten Schritt erfolgt dann die Bildung von GSH aus γ -Glutamylcystein und Glycin unter Aktivität der Glutathion-Synthetase (Marí et al. 2009; Meister & Anderson 1983). Die Synthese des GSH erfolgt in allen Zelltypen, wobei die wichtigste Lokalisation der Produktion und Exkretion die Leber darstellt (Wu et al. 2004). Aufgrund der intrazellulären Synthese ist GSH in den Zellen in einer sehr hohen Konzentration von 0,5-10 mM zu finden (Meister & Anderson 1983).

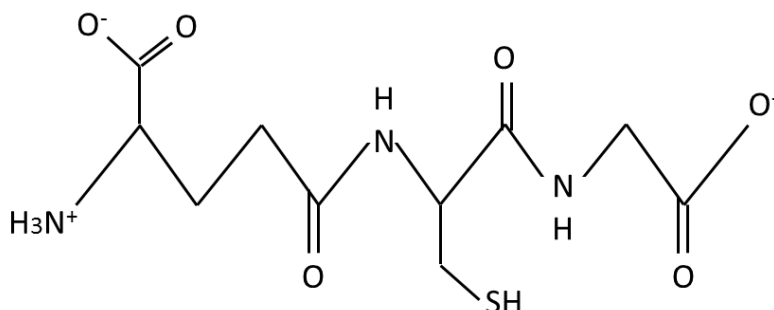


Abbildung 7: Strukturformel des Tripeptids Glutathion

Diese wichtige Thiolverbindung übernimmt zahlreiche biologische Funktionen in der Synthese von Proteinen und DNA, dem Aminosäure-Transport, dem Nukleinsäure-Metabolismus und bei der Regulation von Enzymen (Meister & Anderson 1983; Giustarini et al. 2013). Außerdem fungiert GSH als Cofaktor für Enzyme, wie die Glutathionperoxidase und die Glutathion-S-Transferase (Marí et al. 2009) und dient als Speicher- und Transportform des Cysteins. Durch die Zerlegung des GSH, welche durch die γ -Glutamyltranspeptidase katalysiert wird, erfolgt eine Übertragung des γ -Glutamyl-Restes auf eine Akzeptor-Aminosäure (Meister & Anderson 1983).

Die wichtigste Aufgabe des GSH ist die Funktion als Antioxidans und somit der Schutz der Zellen vor oxidativen Schäden. Aufgrund seines niedrigen Redoxpotentials ($E'_0 = -240 \text{ mV}$) ist GSH sehr reaktionsfreudig und kann durch seine Thiolgruppe Elektronen auf ROS übertragen und sie damit unschädlich machen (Marí et al. 2009; Blokhina et al. 2003). In dieser Reaktion entsteht aus zwei GSH-Molekülen das oxidierte Glutathion (GSSG). Das Dimer GSSG wird unter NADPH-Verbrauch und der Aktivität von Glutathion-Reduktase (GR) wieder zu GSH reduziert (Anderson 1998; Grant 2001). Das Verhältnis von GSH zu GSSG ist somit ein gutes Maß für den oxidativen Stress (Marí et al. 2009). Eine niedrige intrazelluläre GSH- und/oder eine hohe GSSG-Konzentration und ein niedriges GSH:GSSG-Verhältnis weist auf ein Redox-Ungleichgewicht und somit auch auf oxidativen Stress hin (Meister & Anderson 1983 und Giustarini et al. 2013). Neben der nicht-enzymatischen Funktion des GSH, kann es außerdem, enzymatisch katalysiert durch die Glutathion-S-Transferase, toxische Komponenten binden und somit unschädlich machen (Anderson 1998).

2.1.5 Enzymatische Antioxidantien

Neben den nicht-enzymatischen Antioxidantien (Kapitel 2.1.4) sind auch besonders die enzymatischen Antioxidantien an der Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt (Blokhina et al. 2003). Alle Zellen in eukaryotischen Organismen enthalten eine Vielzahl von spezialisierten antioxidativen Enzymen, die mit Oxidantien reagieren und diese in der Regel auch unschädlich machen. Die drei wichtigsten antioxidativen Enzyme sind die SOD, die CAT und die GPx (Sies 1997). Die Genexpression und Aktivität dieser drei Enzyme wurde in der vorliegenden Arbeit in verschiedenen

Gewebe untersucht. Im Folgenden werden diese aufgrund dessen ausführlicher dargestellt.

2.1.5.1 Superoxiddismutase

Das Enzym SOD fungiert als erster Mechanismus in der Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies, indem es die Umwandlung des Superoxid-Anions ($O_2^{\cdot-}$) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) katalysiert. Bei dieser Reaktion wird Wasserstoff (H^+) auf $O_2^{\cdot-}$ übertragen, wodurch H_2O_2 und molekularer Sauerstoff (O_2) entsteht (Apel & Hirt 2004; Blokhina et al. 2003) (Abbildung 8).

Das Enzym ist in allen aeroben Organismen und in allen Zellkompartimenten, die oxidativem Stress ausgesetzt sein können, zu finden. Die Literatur unterscheidet drei verschiedene SOD-Typen, die jeweils einen anderen metallischen Kofaktor im aktiven Zentrum enthalten (Blokhina et al. 2003; Fukai & Ushio-Fukai 2011). Alle SOD-Typen katalysieren zwar die gleiche Reaktion, besitzen jedoch eigene spezifische Lokalisationen, die entscheidend für die Redox-Signale unterschiedlicher Kompartimente sind. Die Cu/ZnSOD (SOD1) ist ein Homodimer (32kDa), das vor allem im Zytosol, aber auch in geringer Konzentration im Intermembranraum, im Zellkern, in Lysosomen und Peroxisomen zu finden ist. Die Enzymaktivität der SOD1 im Mitochondrium ist abhängig von der Anwesenheit von Kupfer (Cu) und Zink (Zn), denn bei der Umwandlung von $O_2^{\cdot-}$ durch SOD1 wird das Kupfer im aktiven Zentrum des Enzyms immer wieder reduziert und reoxidiert (Fukai & Ushio-Fukai 2011) (Abbildung 8).

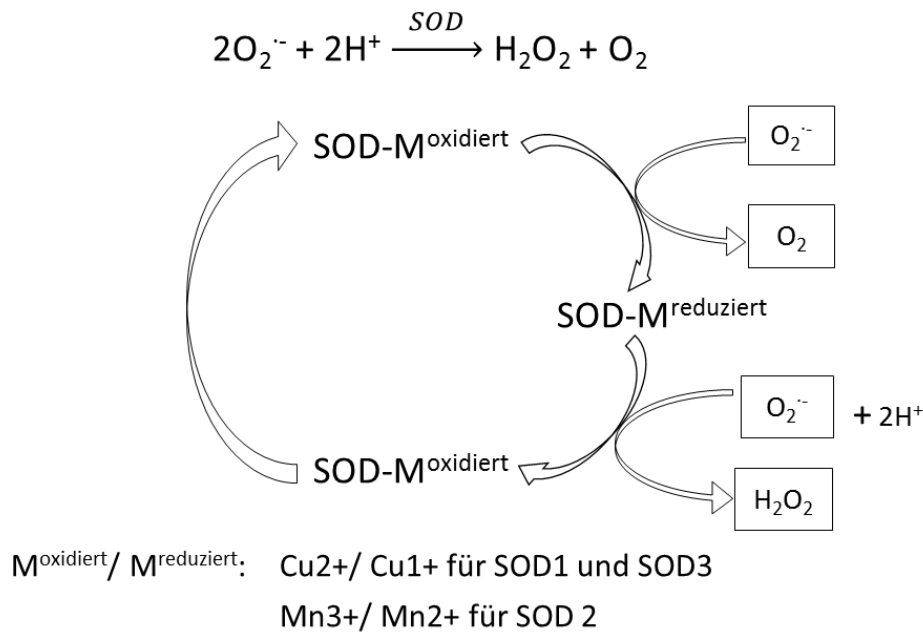


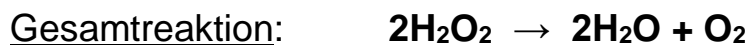
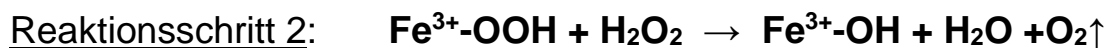
Abbildung 8: SOD-katalysierte Umwandlung von O₂^{·-} zu H₂O₂ mittels Reduktion und Reoxidation von Metallen im reaktiven Zentrum. Abkürzungen: SOD: Superoxiddismutase; SOD-M^{oxidiert}: oxidiertes Metall im aktiven Zentrum der SOD; SOD-M^{reduziert}: reduziertes Metall im aktiven Zentrum der SOD; O₂^{·-}: Superoxidanionradikal; O₂: molekularer Sauerstoff; H₂O₂: Wasserstoffperoxid. Schema in Anlehnung an Fukai & Ushio-Fukai (2011)

Die MnSOD (SOD2) ist ein Homotetramer (96kDa) mit Mangan (Mn) im aktiven Zentrum und ist in den Mitochondrien lokalisiert. Die SOD2 katalysiert die Reaktion von O₂^{·-} zu H₂O₂ in gleicher Art und Weise wie auch die SOD1 und SOD3. Das extrazellulär vorkommende Enzym SOD3 (auch ecSOD) ist ein Homotetramer (135kDa). Wie auch bei der SOD1 übernimmt das Kupfer im aktiven Zentrum eine katalytische Funktion, während das Zink der Stabilisierung dient. Die SOD3 kommt vor allem im extrazellulären Raum von Blutgefäßen und auf Zelloberflächen vor (Fukai & Ushio-Fukai 2011). Fridovich (1975) beschreibt außerdem die FeSOD, die lediglich in prokaryotischen Zellen und Chloroplasten nachgewiesen ist.

2.1.5.2 Katalase

Die CAT kommt in fast allen aeroben Organismen vor und ist neben den Peroxidasen das wichtigste Enzym zum Schutz der Zellen vor toxischen Effekten durch H₂O₂. Sie ist vor allem in den Peroxisomen der Zelle zu finden und ist bei der Biogenese dieser

Zellorganellen eingebunden (Blokhina et al. 2003; Reid et al. 1981). In der Literatur ist außerdem beschrieben, dass die CAT wichtige Aufgaben bei Entzündungsprozessen, der Mutagenese, dem Schutz vor Apoptose und bei der Stimulation vieler Tumorarten übernimmt (Putnam et al. 2000). CAT ist ein Homotetramer (ca. 60 kDa), das in jede Untereinheit eine Hämo- Eisen- Struktur in Form von Ferriprotoporphyrin IX enthält (Kirkman & Gaetani 2007). Das H_2O_2 wird durch die CAT in zwei Reaktionsschritten zu Sauerstoff (O_2) und Wasser (H_2O) umgesetzt. Im ersten Schritt der Reaktion wird das Enzym oxidiert und das H_2O_2 reduziert, wodurch das Produkt H_2O entsteht. Im zweiten Teil der Reaktion erfolgt eine Reduktion der CAT und des H_2O_2 , was zur Entstehung von O_2 und einem weiteren Molekül H_2O führt (Deisseroth & Dounce 1970; Reid et al. 1981). Das H_2O_2 entsteht zum einen beim Abbau von Superoxiden durch die SOD, aber auch im Rahmen der peroxisomalen Oxidation. Beispielsweise fällt bei der β -Oxidation von Fettsäuren durch die Acyl-CoA-Oxydase (ACO) H_2O_2 an (Schrader & Fahimi 2006).



2.1.5.3 Glutathionperoxidase

Die GPx ist ein Selenoenzym und Bestandteil des antioxidativen Schutzsystems. Das GPx-Molekül ist ein Homotetramer und enthält vier Selenatome im aktiven Zentrum, die als Coenzyme fungieren. Die Aktivität der GPx kann dementsprechend durch einen Selenmangel negativ beeinflusst werden (Shaaban et al. 2003; Lawrence & Burk 1976). Die GPx kommt in unterschiedlichen Geweben und Organen vor, wobei die höchste Aktivität in den Erythrozyten und in der Leber nachgewiesen werden kann, während in Herz und Lunge eine mittlere und in der Muskulatur eine niedrige Aktivität zu finden ist. Das Enzym verteilt sich innerhalb der Zelle zu 2/3 im Zytoplasma und zu 1/3 in den Mitochondrien (Chance 1979). Genau wie auch die CAT schützt die GPx Zellen vor oxidativen Schäden, indem sie die Reduktion von H_2O_2 katalysiert. Außerdem ist GPx in der Lage Fettsäure-Hydroperoxide unschädlich zu machen (Surai

1999). Die Literatur unterscheidet vier verschiedene GPx-Formen. Die klassische GPx (cGPx), die Phospholipidhydroperoxid-GPx (PHGPx), die Plasma-GPx (pGPx) und die gastrointestinale Form der GPx (GI-GPx). All diese GPx reduzieren H_2O_2 zu H_2O und organische Hydroperoxide zu dem korrespondierenden Alkohol. Bei dieser Reaktion wird Glutathion (GSH) als Cofaktor genutzt, was dazu führt, dass GSH in seine oxidierte Form GSSG umgesetzt wird (Abbildung 9). GSSH kann im Anschluss in Anwesenheit von NADPH durch die Glutathion-Reduktase wieder reduziert werden (siehe Kapitel 2.1.4.3) (Mezzetti 1990; Brigelius-Flohé 1999)

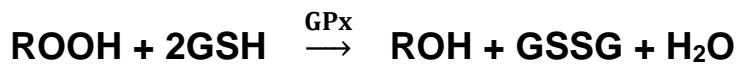


Abbildung 9: Durch GPx katalysierte Reduktion von Peroxidverbindungen.

Peroxidverbindungen bzw H_2O_2 werden in der GPx-katalysierten Reaktion zu den korrespondierenden Alkoholen bzw H_2O reduziert. Gleichzeitig erfolgt eine Oxidation von reduziertem Glutathion (GSH) zu oxidiertem Glutathion (GSSG); R= H oder Organylgruppe. Reaktion in Anlehnung an Chance (1979)

2.2 Methionin

2.2.1 Methionin in der Broilerfütterung

In den handelsüblich verwendeten Futterrationen der Broilermast, die auf Weizen, Soja und Mais basieren, ist Methionin meistens die erstlimitierende Aminosäure (Swennen et al. 2011). Ein ernährungsbedingter Mangel an schwefelhaltigen Quellen (Methionin und Cystein) kann sich negativ auf die Gesundheit der Tiere auswirken. Folgen, wie vermindertes Wachstum, Stoffwechselstörungen oder ein geschwächtes Immunsystem, können auftreten (Bunchasak 2009, Swennen et al. 2011). Außerdem ist das erhöhte Risiko von kardiovaskulären Erkrankungen und Schlaganfällen beim Menschen beschrieben (Ingenbleek & Kimura 2013). Aufgrund dessen wird Methionin in der landwirtschaftlichen Praxis durch die Zufütterung synthetisierter Methioninquellen supplementiert, um die Produktion zu optimieren. Diese Supplementierung nützt vor allem in Bezug auf die Reduzierung der Produktionskosten, verbessertes Wachstum, die optimale Ausbeute an essbarem Fleisch, verringertem Fettgewebsanteil und die Selektion von Nachkommen für

Zuchtprogramme. Zudem fördert eine ausgewogene Nährstoffaufnahme der Tiere den Erhalt der Ressourcen und die Reduzierung von Abfall (Bunchasak 2009). Auf dem Markt sind unterschiedliche Methionin-Produkte, darunter DL-Methionin (DLM) und das Methionin-Hydroxy-Analog (MHA), erhältlich (Martín-Venegas et al. 2006). Diese beiden Methioninquellen sollen in den folgenden Untersuchungen, in Bezug auf ihre Auswirkung auf das antioxidative System, verglichen werden.

DLM wird in einem chemischen Prozess aus den Rohstoffen Erdöl, Erdgas, Luft und Wasser über die Zwischenstoffe Acrolein, Methylmercaptan und Blausäure synthetisiert (Binder 2004). Es liegt kommerziell als kristallines Pulver vor und verfügt über einen Reinheitsgrad von über 99%. Die DL-2-Hydroxy-4-Methylthiobuttersäure (MHA), kann als freie Säure oder als Calciumsalz vorliegen und besitzt im Vergleich zu DLM lediglich einen Methioningehalt von 88% (Sauer et al. 2008). Da MHA keine Amino-Gruppe besitzt, ist es keine richtige Aminosäure, sondern eine Aminosäurevorstufe.

Die relative biologische Wirksamkeit von MHA im Vergleich zu DLM ist in den letzten Jahrzehnten Thema zahlreicher wissenschaftlicher Studien gewesen und nach wie vor nicht vollständig geklärt. Es wurde eine Bioeffizienz des MHA im Verhältnis zu DLM auf äquimolarer Basis von 62 bis 100% ermittelt (Baker & Boebel 1980; Bunchasak 2009; Lemme et al. 2002). Die genannten Autoren beziehen sich bei ihren Untersuchungen meist auf die Gewichtszunahmen, die Futterverwertung oder den Fleischansatz der Broiler.

Methionin ist neben Cystein die einzige schwefelhaltige proteinogene Aminosäure und spielt daher eine entscheidende Rolle beim Proteinaufbau (Brosnan et al. 2007). Wie auch in Vieira et al. (2004) beschrieben, ist Methionin vor allem für den Muskelansatz und die Federproduktion enorm wichtig, sowie für einige biochemische Prozesse und Stoffwechselwege unentbehrlich. Der optimale Methioningehalt im Futter ist abhängig von der Konzentration des Gesamtproteins. Laut Bunchasak (2009) liegt der optimale Methioningehalt bei 2,5-4% des Gesamtproteins. Außerdem richtet sich der Anteil an schwefelhaltigen Aminosäuren (Methionin und Cystein) nach dem Produktionsziel (Vieira et al. 2004). Andererseits kann eine übermäßige Zufuhr an Methionin auch negative Einflüsse haben (Harper et al. 1970). Die Ergebnisse der Studie von Acar et al. (2001) zeigen beispielsweise, dass eine 3,68-fach höhere Methioninfütterung im Vergleich zu dem empfohlenen Minimalbedarf (0,50%, NRC 1994) in einer signifikant

niedrigeren Futteraufnahme vom 4. bis zum 11. Tag der Mast resultiert. Außerdem führt eine übermäßige Methioninzufuhr (1-2% über der basalen Ration) zu einem vermindertem Wachstum und Gewebeschäden (Harter & Baker 1978).

2.2.1 Methioninmetabolismus

Methionin hat aufgrund seiner Struktur (Abbildung 10) einige wichtige Eigenschaften und übernimmt zahlreiche Funktionen im Organismus. Die terminale Methylgruppe gibt der Methionin-Seitenkette einen hydrophoben Charakter, wodurch sich zwei Drittel der Moleküle im hydrophoben inneren Teil der Proteine befinden (Brosnan & Brosnan 2006). Der Teil des Methionins, der sich an der Proteinoberfläche befindet, ist in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies anzugreifen. Das Schwefelatom kann zu einem Sulfoxid-Ion oxidieren und die ROS somit unschädlich machen (Levine et al. 1996).

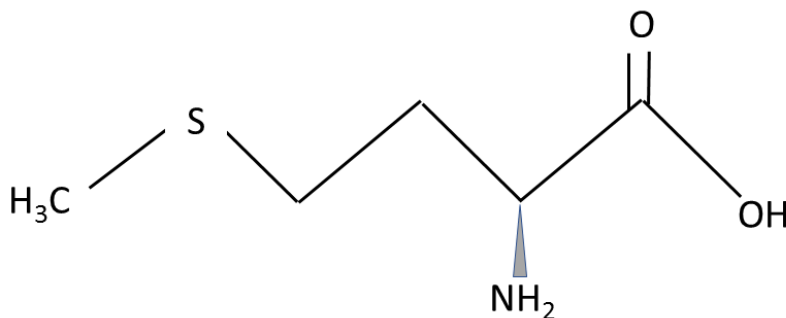


Abbildung 10: Strukturformel des Methionins

Des Weiteren kommt Methionin eine essentielle Bedeutung bei der Bildung von Proteinen zu. Es ist die initiale Aminosäure bei der Proteinbiosynthese, da Methionin durch das Startcodon *AUG* codiert ist. Die meisten Methioninreste werden nach der Proteinbiosynthese wieder abgespalten, was darauf schließen lässt, dass die wesentliche Aufgabe die Initialisierung der Translation und nicht die Strukturgebung von Proteinen ist (Brosnan et al. 2007). Außerdem ist Methionin im Geflügelorganismus für weitere Aufgaben zuständig. Es ist ein Vorläufer der Zwischenprodukte vieler Stoffwechselwege, wie z.B. Cystin und Carnitin. Weiterhin ist diese Aminosäure notwendig zur Synthese von Polyamiden, die an der Nukleolus- und Zellteilung beteiligt sind. Eine besondere Bedeutung liegt darüber hinaus darin, dass

Methionin als Schwefel- und Methylgruppen-Donor im Stoffwechsel fungiert (Bunchasak 2009). Auf den genauen Metabolismus wird im Folgenden genauer eingegangen.

Die beiden Methioninquellen DLM und MHA müssen zunächst im Gastrointestinaltrakt absorbiert werden, um anschließend in L- Methionin umgewandelt und für die Proteinsynthese genutzt zu werden (Dibner & Knight 1984 und Richards et al. 2005). Wie auch bei anderen Aminosäuren, erfolgt die Absorption des DLM in erster Linie durch sekundär aktiven Transport und nur in geringerem Maße durch Carrier-abhängigen Transport. Beide Mechanismen finden prinzipiell im Dünndarm statt und besonders schnell im Ileum (Dibner & Knight 1984 und Richards et al. 2005). Für beide Mechanismen werden Transporter in der Zellmembran benötigt, da das DLM aufgrund seiner polaren Struktur nicht durch die Polypeptidmembran diffundieren kann und für den aktiven Transport des DLM immer zelluläre Energie in Form von ATP notwendig ist (Brandsch & Brandsch 2003). Außerdem konkurrieren die beiden Isomere des DLM um die gleichen Transportproteine, wobei diese Transporter in der Regel eine viel niedrigere Affinität zum D- Isomer als zum L- Isomer haben (Lerner & Wight Taylor 1967 und Brachet et al. 1987).

Die Absorption des MHA unterscheidet sich von der des DLM. Das MHA wird in einer Kombination aus Diffusion und Carrier-abhängigem Transport absorbiert. Bei einer höheren Konzentration an MHA (7 mM und mehr) erfolgt die Absorption vermehrt durch Diffusion, wohingegen der Carrier- abhängige Transport bei einer niedrigeren MHA-Konzentration eine größere Rolle spielt (Brachet & Puigserver 1987). Die Diffusion, als wichtiger Mechanismus der MHA-Absorption, hängt mit der chemischen Struktur des MHA als organische Säure zusammen (Dibner & Buttin 2002). Ist eine organische Säure undissoziiert, ist sie in der Lage durch die Zellmembran in die Zelle zu diffundieren (Von Engelhardt et al. 1989). Dies erfolgt vor allem im oberen Gastrointestinaltrakt, da der pH- Wert dort vergleichsweise niedrig ist. Richards et al. (2005) beschreiben in ihrer Studie, dass am Ende des Duodenums schon 85% des gefütterten MHA nicht mehr nachweisbar ist und somit bereits vorher absorbiert sein worden muss. Dennoch kann MHA über die gesamte Länge des Gastrointestinaltraktes und somit vollständig aufgenommen werden (Richards et al. 2005).

Mehrere Veröffentlichungen zeigen, dass die Absorptionsrate des MHA gleich groß oder größer ist als die des DLM, aber beide Methioninquellen vollständig im Verdauungstrakt absorbiert werden (Dibner et al. 1992; Esteve-Garcia & Austic 1993 und Richards et al. 2005). Dabei ist die Aufnahme von DLM und MHA im Darm unter neutralen Temperaturbedingungen annähernd gleich, aber die Absorption des MHA ist größer, wenn die Broiler Hitzestress ausgesetzt sind (Dibner et al. 1992). Esteve-Garcia & Austic (1993) sagen, dass eine unterschiedliche Auswirkung der beiden Methioninquellen auf die Leistung der Broiler nicht auf die intestinale Absorption zurückzuführen sind, da sowohl MHA als auch DLM komplett im Dünndarm absorbiert werden.

Drew et al. (2003) untersuchten in ihrer Studie die Aufnahme von MHA und DLM im distalen Ileum und verglichen dabei die Absorption in keimfreien und konventionellen Broilern, um den Einfluss der intestinalen Bakterienflora zu ermitteln. Die Ergebnisse zeigten, dass 3 Stunden nach der Fütterung signifikant weniger restliches MHA in keimfreien Broilern (4,7%) im Vergleich zu konventionellen Broilern (10,2%) im distalen Ileum vorhanden war. Bei der Fütterung mit DLM hingegen zeigte sich kaum ein Unterschied zwischen der Methioninabsorption in keimfreien (3,0%) und konventionellen Broilern (3,7%). Vergleichbare Ergebnisse gab es auch in einer ähnlichen Studie mit Schweinen (Malik et al. 2009). Es wird vermutet, dass die Bakterien der Darmflora MHA teilweise für ihren Metabolismus nutzen. Die Verfügbarkeit des MHA für die Absorption im Darm ist daher geringer im Vergleich zu DLM. Ob das MHA als Substrat von den intestinalen Bakterien bevorzugt wird oder die langsamere Absorptionskinetik des MHA im Verhältnis zum DLM dem mikrobiellen Metabolismus eine bessere Möglichkeit bietet, ist dabei unklar (Drew et al. 2003 und Malik et al. 2009).

Nach der Aufnahme über den Darm muss das MHA und das D-Methionin in L-Methionin umgewandelt werden, da nur dieses im Proteinstoffwechsel genutzt werden kann. Um das MHA und das DLM in die metabolisch aktive Form L-Methionin umzuwandeln, sind zwei enzymatische Schritte nötig. Zuerst die stereospezifische Oxidation des α -Kohlenstoffatoms zu 2-Keto-4-Methylthio-Butansäure (KMB) und anschließend die Transaminierung der KMB zu L-Methionin (Dibner & Knight 1984 und Martín-Venegas et al. 2006). Während beim MHA sowohl D-MHA und L-MHA überführt werden müssen, ist dies beim DLM nur für das D-Isomer nötig. Die Oxidation der

verschiedenen Isomere wird durch unterschiedliche Enzyme katalysiert (Abbildung 11). Während die peroxisomalen Enzyme D-Aminosäure-Oxidase und L-Hydroxy-Säure-Oxidase für die Umwandlung von D-Methionin und L-MHA vor allem in Leber und Niere nachgewiesen sind, oxidiert die mitochondriale D-Hydroxy-Säure-Dehydrogenase das D-MHA in vielen verschiedenen Geweben, wie Leber, Muskel und Darmmucosa (Dibner & Knight 1984; Barnes et al. 1995). Die Transaminierung der KMB ist ebenso gewebespezifisch. Die höchste Aktivität der Umwandlung ist in der Niere zu finden, wohingegen Lebergewebe und Darmmucosa eine mittlere und die Skelettmuskulatur eine niedrige Aktivität aufweisen (Rangel-Lugo & Austic 1998).

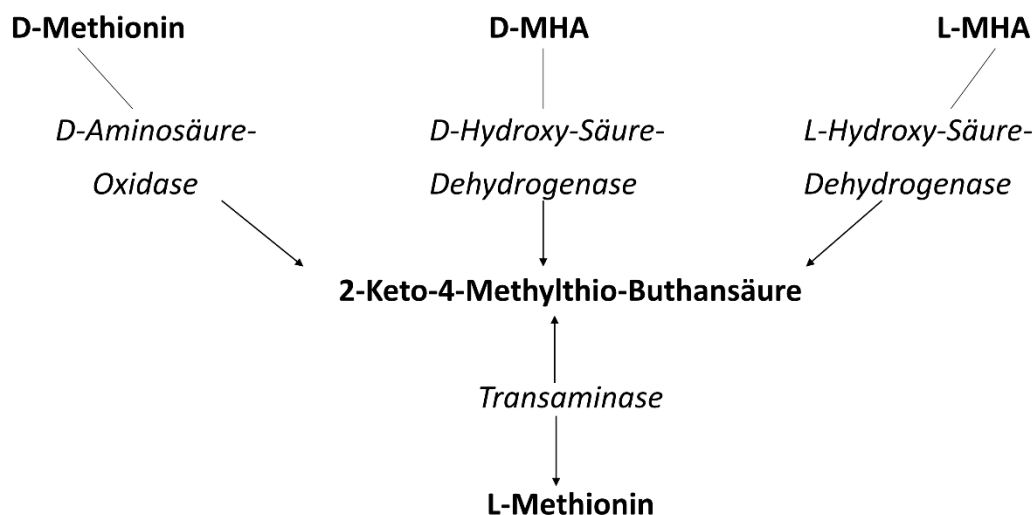


Abbildung 11: Die Umwandlung von D-Methionin und DL-MHA zu L-Methionin. Die Isomere D-Methionin, D-MHA und L-MHA werden unter Aktivität der substratspezifischen Enzyme D-Aminosäure-Oxidase, D-Hydroxysäure-Dehydrogenase und L-Hydroxysäure-Oxidase zu 2-Keto-4-Methylthio-Butansäure (KMB) oxidiert. KMB wird in einem zweiten Schritt zu L-Methionin transaminiert. Schema in Anlehnung an Farke (2011)

Der Metabolismus des Methionins ist in Abbildung 12 dargestellt und kann unterteilt werden in Transmethylierung, Remethylierung und Transsulfonierung (Brosnan et al. 2007; Finkelstein 2006). Das L-Methionin wird durch die Verbindung mit ATP und die Aktivität der Methionin-Adenosyl-Transferase (MAT) zu S-Adenosylmethionin (SAM) umgewandelt. Dieses fungiert als Methylgruppen-Donor in zahlreichen Stoffwechselprozessen. Die MAT1 ist in der Leber zu finden, wohingegen MAT2 in allen anderen Geweben aktiv ist (Finkelstein 2006). Nachdem SAM eine Methylgruppe mit Hilfe von Methyltransferasen übertragen hat entsteht das S-Adenosylhomocystein (SAH). Aus SAH entstehen anschließend unter Aktivität der S-Adenosin-Homocystein-Hydrolase Adenosin und Homocystein. In einer weiteren Reaktion wird dann Homocystein zu Methionin remethyliert. Dies geschieht entweder durch die Methionin-Synthase oder die Betain-Homocystein-Methyl-Transferase (BHMT) (Métayer et al. 2008; Brosnan et al. 2007). Die Methionin-Synthase ist ein ubiquitäres Enzym, wohingegen die BHMT primär in der Leber und teilweise in der Niere exprimiert wird (Brosnan et al. 2007). Außerdem ist Homocystein am Stoffwechselweg der Transsulfonierung beteiligt, der nur in Leber, Niere, Dünndarm und Pankreas eine hohe Aktivität aufweist. Bei der Transsulfonierung entsteht in zwei Schritten Cystein, was durch die Enzyme Cystathionin- β -Synthase und Cystathionin- γ -Lyase katalysiert wird. Cystein wiederum ist ein Ausgangsprodukt der Synthese von Glutathion und Taurin, die beide einen wichtigen Abwehrmechanismus gegen den oxidativen Stress darstellen (Brosnan et al. 2007; Finkelstein 2006; Métayer et al. 2008). Während Taurin die Produktion von ROS in den Mitochondrien verringert (Jong et al. 2012), ist Cystein eine Vorstufe des wichtigen Antioxidans Glutathion (siehe Kapitel 2.1.4.3) (Marí et al. 2009). Da die Umwandlung von Homocystein zu Cystein irreversibel ist, kann Methionin zwar in Cystein, Cystein aber nicht in Methionin umgewandelt werden. Ein Methioninmangel lässt sich somit nicht durch Cystein ausgleichen (Brosnan & Brosnan 2006). Stehen dem Organismus zu einem Zeitpunkt nur wenige schwefelhaltige Aminosäuren zur Verfügung, setzt er seine Priorität auf die Remethylierung. Im Gegensatz dazu wird, bei einer hohen Verfügbarkeit von Methionin, mehr SAM in den Stoffwechselweg der Transsulfurierung geschleust und somit auch mehr Cystein gebildet (Ingenbleek & Kimura 2013).

Im Vergleich zu DLM wurden beim Einsatz von MHA bereits höhere Konzentrationen an Cystein und Taurin im Darmgewebe von Broilern gefunden (Martín-Venegas et al. 2006). Swennen et al. (2011) beschreibt zudem, dass bei der Fütterung mit MHA im

Vergleich zu DLM die Lipidoxidation im Plasma und somit auch der oxidative Stress verringert ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Darmbarriere in kultivierten menschlichen Darmzellen, in denen eine Entzündung simuliert wurde, beim Einsatz von MHA besser erhalten bleibt, als wenn DLM eingesetzt wird (Martín-Venegas et al. 2013).

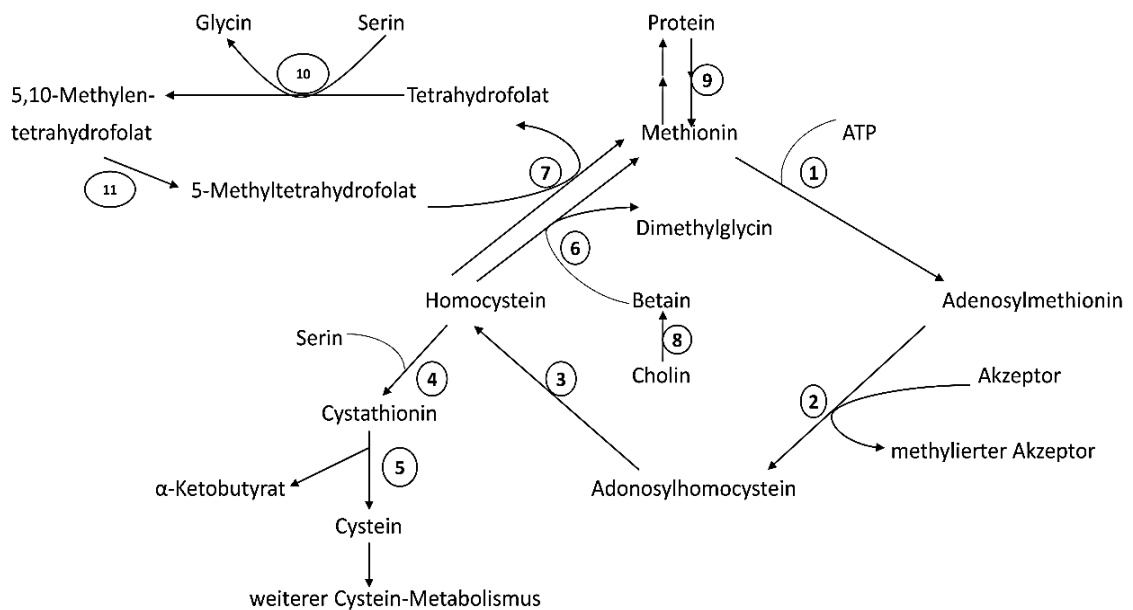


Abbildung 12: Methionin-Stoffwechsel. Der Methionin-Kreislauf umfasst die Reaktionen 1,2,3 und 6; die Reaktionen 1,2,3,4 und 5 bilden den Stoffwechselweg der Transsulfonierung; die Transmethylierung umfasst die Reaktionen 1, 2 und 3; die Zahlen stellen die entsprechenden Enzyme oder Abschnitte dar; 1: Methionin-Adenosyl-Transferase (MAT); 2: S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferasen; 3: S-Adenosin-Homocystein-Hydrolase; 4:Cystathionin-β-Synthase; 5: Cystathionin-γ-Lyase; 6: Betain-Homocystein-Methyl-Transferase; 7:Methionin-Synthase; 8: Cholin- und Betain-Aldehyd-Dehydrogenase; 9: Gleichgewicht zwischen freiem und proteingebundenem Methionin; 10: Glycin-Hydroxymethyltransferase; 11: Methylen-tetrahydrofolat-Transferase. Schema in Anlehnung an Finkelstein (2006)

3 Zielsetzung

Wie schon bekannt ist, können durch die Anreicherung von ROS verschiedene Zellkomponenten geschädigt werden (Birben et al. 2012). Oxidativer Stress kann daher die Entstehung von Krankheiten bei Tieren begünstigen und deren Produktionsleistung negativ beeinflussen (Lykkesfeldt & Svendsen 2007, Salami et al. 2015). Um die Produktion zu optimieren, wird Methionin in den typischen proteinreduzierten Rationen der kommerziellen Geflügelmast durch synthetische Methioninquellen wie DLM und MHA supplementiert, da diese meistens die erstlimitierende Aminosäure ist (Bunchasak 2009 und Martín-Venegas et al. 2006). Die erstlimitierende Aminosäure in einem Tier entscheidet über die Verwertung des Nahrungsproteins für den Aufbau von Körperprotein. Die fehlende Aminosäure begrenzt also die Proteinbiosynthesekapazität. Zudem ist Methionin neben der Strukturgebung von Proteinen auch essentiell für die Initialisierung der Translation (Brosnan et al. 2007). Steht dem Organismus eine essenzielle Aminosäure, wie z.B. Methionin, nicht in ausreichender Menge zur Verfügung, resultiert dies aufgrund der niedrigeren Proteinbiosynthesekapazität in schlechteren Wachstumsleistungen und einer verminderten Kapazität der Enzymsynthese (Summers et al. 1992).

Außerdem übernimmt Methionin zahlreiche weitere wichtige Funktionen im Organismus und kann besonders als Vorstufe des Antioxidans Glutathion für den antioxidativen Status von Bedeutung sein. Methionin kann zu Cystein umgewandelt werden, welches wiederum ein Bestandteil des Glutathions ist und außerdem zu Taurin abgebaut werden kann. Es ist nachgewiesen, dass diese beiden Schwefelverbindungen eine wichtige Rolle in der Abwehr von ROS spielen (Swennen et al. 2011; Métayer et al. 2008; Zhang et al. 2014, Jong et al. 2012). Der vorliegenden Studie liegt somit die Hypothese zugrunde, dass durch die Zulage von Methionin die GSH-Synthese gesteigert wird und dies, aufgrund der Oxidationsfähigkeit des GSH, in einer höheren antioxidativen Kapazität resultiert. Es soll in diesem Zusammenhang untersucht werden, wie sich zum einen eine suboptimale Methioninversorgung (Kontrollgruppe) im Vergleich zu einer bedarfsgerechten Methionin-Supplementierung (0,1% Methionin) auswirkt und zum zweiten, ob eventuelle positive Effekte durch eine Methioninzulage, die über die Empfehlungen hinaus geht (0,25% und 0,4% Methionin), zusätzlich gesteigert werden. Zusätzlich zu den Effekten der Methioninkonzentration

Zielsetzung

sollen auch die unterschiedlichen Auswirkungen des Einsatzes von DLM und MHA in der vorliegenden Studie untersucht und verglichen werden. Da die beiden Methioninquellen in der Literatur schon vielfach in Bezug auf andere Parameter verglichen wurden (Willemsen et al. 2011, Liu et al. 2004, Esteve-Garcia & Llauroadó 1997, Dänner & Bessei 2002), soll in dieser Studie gezeigt werden, ob es zwischen den beiden Quellen unterschiedliche Effekte auf das antioxidative System beim Broiler gibt. Es ist zu klären, ob MHA in den von uns verwendeten Methioninkonzentrationen, die antioxidative Kapazität positiver beeinflusst als DLM.

Der Versuchsaufbau beinhaltet dafür eine Kontrollgruppe und die beiden Methioninquellen in je drei Zulagehöhen (0,1%, 0,25 % und 0,4% DLM und MHA supplementiert auf equimolarer Basis). Die Leistung der unterschiedlichen Versuchsgruppen soll anhand der Futteraufnahme, der Gewichtszunahme, der Lebendgewichte und der Schlachtkörperdaten beurteilt werden. Um Rückschlüsse auf den antioxidativen Status ziehen zu können, werden nicht-enzymatische Bestandteile des antioxidativen Systems (GSH, Tocopherol) und antioxidative Enzyme (SOD, CAT und GPx) sowie Produkte des oxidativen Stresses (PC und TBA-RS) in verschiedenen Geweben und im Plasma untersucht.

Es wird davon ausgegangen, dass mit einer steigenden Methionin-Supplementierung auch die gemessenen nichtenzymatischen Antioxidantien (GSH und Tocopherol) eine höhere Konzentration aufweisen. Aufgrund der vermehrten Synthese von GSH durch die Zulage von Methionin wird die antioxidative Kapazität gesteigert und andere Antioxidantien werden in geringerem Umfang benötigt, um ROS unschädlich zu machen. Folglich wird z.B. Tocopherol weniger verbraucht und ist in höherer Konzentration messbar. Bei den antioxidativen Enzymen (SOD, CAT und GSH) sowie Oxidationsprodukten (TBA-RS und PC) ist hingegen zu vermuten, dass die Konzentration bzw. Aktivität niedriger ist. Da davon ausgegangen wird, dass in den Methionin-supplementierten Gruppen mehr GSH vorhanden ist, werden auch mehr ROS durch dieses unschädlich gemacht und folglich die Synthese von SOD, CAT und GPx herunter reguliert. Der Grund dafür ist, dass ROS Transkriptionsfaktoren wie z.B. *Nrf2* aktivieren, die für die Transkription der antioxidativen Enzyme verantwortlich sind (Gorrini et al. 2013 und Kaspar et al. 2009). Die gesteigerte Abwehr der ROS durch die höhere GSH-Konzentration ist ebenso ausschlaggebend für die vermutlich geringere Konzentration an TBA-RS und PC. Sind die ROS in großer Menge

Zielsetzung

vorhanden, kommt es zur oxidativen Schädigung von Makromolekülen, wie z.B. Lipiden und Proteinen (Celi & Gabai 2015). Die Konzentration an Oxidationsprodukten (TBA-RS und PC) ist daher geringer, wenn Antioxidantien in ausreichender Menge vorhanden sind.

Dieses Experiment soll Aufschluss darüber geben, inwiefern der Einsatz einer bestimmten Methioninquelle und -konzentration sich in der Broilermast auf das antioxidative System der Tiere auswirkt. Eine optimierte Supplementierung von Methionin hat in der konventionellen Broilermast einen erheblichen praktischen Nutzen. Durch die richtige Methioninversorgung können sowohl das Wachstum als auch die Ausbeute an essbarem Fleisch und der Fettgewebsanteil optimiert und somit die Produktionskosten reduziert werden. Zudem fördert eine ausgewogene Nährstoffaufnahme der Tiere den Erhalt der Ressourcen und die Reduzierung von Abfall (Bunchasak 2009).

4 Material und Methoden

Dieser Arbeit liegt ein Versuch zu Grunde, der auf der Fütterung von Broilern mit unterschiedlichen Methioninquellen (DL-Methionin und Methionin-Hydroxyanalog) und Methioninkonzentrationen basiert. Anhand der Leistungsdaten und spezifischer Untersuchungen von Plasma- und Gewebeproben sollen Rückschlüsse auf die Beeinflussung des antioxidativen Systems durch Methionin gezogen werden.

Der Versuch wurde im Stoffwechsellabor des Instituts für Tierernährung und Ernährungsphysiologie, Heinrich-Buff-Ring 21, 35392 Gießen durchgeführt.

4.1 Versuchstiere und Haltung

Als Versuchstiere wurden insgesamt 336 männliche Broiler der Zuchtlinie Cobb500 der Firma Cobb Germany AVIMEX GmbH (Wiedemar, Deutschland) als Eintagsküken eingestallt. Die Tiere wurden in 7 Behandlungsgruppen unterteilt, die sich in Methionin-Quelle bzw. Methionin-Konzentration unterschieden und es wurde auf ein einheitliches Anfangsgewicht geachtet. Aufgrund der begrenzten Stallkapazität von 14 Käfigen wurden 3 Durchgänge à 5 Wochen durchgeführt. Pro Behandlungsgruppe und Durchgang gab es 2 Käfige mit je 7-9 Tieren, denen eine Grundfläche von 2,13 m² zur Verfügung stand. Ein Käfig entsprach dabei einer Wiederholung und somit gab es insgesamt 6 Wiederholungen pro Behandlung als statistische Größe. Ausgestattet waren die Käfige mit Nippeltränken und Futterautomaten (Abbildung 13), so dass den Broilern während der gesamten Versuchszeit Wasser und Futter ad libitum zugänglich waren. Die Lichtintensität lag konstant bei 30 Lux und das Lichtregime war 24h:0h; 23h:1h; 22h:2h; 21h:3h; 20h:4h; 19h:5h (Licht: Dunkelheit) in den Tagen 1,2,3,4,5,6 und wurde ab Tag 7 mit 18h:6h weitergeführt. Die Temperatur nahm im Laufe der 5 Wochen von 28-29°C auf 24°C ab. In den ersten Tagen wurden Infrarotlampen genutzt, um die Temperatur dem Verhalten der Tiere anzupassen. Alle experimentellen Durchführungen befolgten den Anhang A des Europäischen Übereinkommens zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere (Vertrag-Nr. 123). Nach der Starter-, Grower- und Finisher-Phase (Tag 10, 21 und 35) wurde je 1 Tier pro Käfig geschlachtet und Gewebeproben

entnommen. Nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes (§ 4 Abs. 3) wurden die Tiere fachgerecht zu wissenschaftlichen Zwecken getötet. Dies wurde vom Tierschutzbeauftragten der JLU Gießen überprüft (Tötungsmeldung 580_M).



Abbildung 13: Broiler-Stall an Tag 21 (links) und Broiler am 35. Tag (rechts)

4.2 Fütterung

Die Grundlage der Fütterung bestand aus einer Futterration, die auf Weizen, Soja und Mais basierte (Tabelle 1) und in dem Nährstoffe nach den Empfehlungen des *National Research Council* (NRC, 1994) enthalten waren (Tabelle 2). Die Versorgung mit Vitaminen und Mineralstoffen wurde durch einen „Premix Broiler“ der Firma MIAVIT GmbH (Essen, Deutschland) sichergestellt. Die phasenspezifische Basisration (Tag 1- 10, Tag 11-21 und Tag 22-35) deckte den Erhaltungs- und Wachstumsbedarf der Tiere. Nur der basale Methioningehalt der Broilerration lag geringfügig unter den Empfehlungen des NRC (1994) und Cobb500™ (2015) für maximales Wachstum, war aber hoch genug, um immer noch gute Wachstumsraten zu erzielen. Den Methionin-supplementierten Versuchsgruppen wurde Methionin in steigender Menge zugelegt, um die Wirkung der beiden Methioninquellen vergleichen zu können (Tabelle 3). Als Methioninquellen kamen DL- Methionin (DLM) der Firma Evonik Degussa GmbH (Essen, Deutschland) und das flüssige DL-2-hydroxy-4-(methythio) butanoic acid (DL-HMTBA) (im Weiteren als Methionin-Hydroxy-Analog (MHA) beschrieben) der Firma Novus (Saint Charles, Missouri, USA) zum Einsatz. Da das MHA-Produkt eine

Material und Methoden

DL- MHA-Konzentration von 88% enthielt und 58,6% des Produktes im Produkt/ Sipernat-Mix verwendet wurde, enthielt das verwendete MHA-Produkt eine finale Methioninkonzentration von lediglich 51,7 %. Um eine äquimolare Methioninkonzentration zum DLM zu erhalten, wurde eine entsprechend höhere MHA- Zulage verwendet (Starter-Phase: 0,19 %, Grower-Phase: 0,49 %, Finisher-Phase: 0,78 %). So existierten pro Methioninquelle drei verschiedene Zulagestufen (0,10 %, 0,25 %, 0,40 %). Gemäß der praxisüblichen 3-Phasen-Mast wurden sowohl die Methioninmenge, als auch die Futterrationen dem Bedarf der Starter- (1.-10. Tag), Grower- (11.-21. Tag) und Finisher-Phase (22.-35- Tag) angepasst (Tabelle 3). Die Starter- und Grower-Rationen enthielten zusätzlich ein Kokzidiostatikum (Maxiban®, 0,6g/kg). Während der Methioningehalt in der Kontrollgruppe moderat unter den Empfehlungen der NRC (1994) lag, enthielten die Methionin- supplementierten Gruppen Methioninkonzentrationen, die den Empfehlungen in etwa entsprachen (DLM 0,1 und MHA 0,1) oder diese sogar übertrafen (DLM 0,25, DLM 0,4, MHA 0,25 und MHA 0,4).

Tabelle 1: Zusammensetzung der Futterrationen in g/kg¹

Bestandteile (g/kg)	Starter	Grower	Finisher
Weizen	313	233	240
Sojaextraktionsschrot	319	236	259
Mais	200	200	200
Erbse	-	170	170
Maisgluten-Mehl	76,9	55,9	11,9
Sojaöl	41,2	53,5	67,1
Dicalcium-Phosphat	19,1	-	-
Monocalciumphosphat	-	16,4	16,6
Futterkalk	9	15,3	19,3
Premix MIAVIT ²	10	10	10
Biolys® (L-Lysin) ³	6,1	3,5	1
NaCl	2,7	2,7	2,7
Natriumbicarbonat	1,2	1,2	1,5
ThreAMINO® (L-Threonin) ³	0,8	0,6	0,3
ValAMINO® (L-Valin) ³	0,3	0,3	-

¹ die Starter- und Grower-Rationen enthielten zusätzlich ein Kokzidiostatikum (Maxiban 0,6g/kg);

² Premix MIAVIT Vitamin- und Mineralstoffgehalte pro kg Futter: 3 g Calcium, 0,1 g Chlor, 12000 IE Vit A, 4000 IE Vit. D3, 50 mg Vit. E (aus α -Tocopherylacetat), 3,33 mg Vit. K3, 250 μ g Biotin, 1,67 mg Folsäure, 3,33 mg Vit. B1, 8 mg Vit. B2, 4,17 mg Vit. B6, 25 μ g Vit. B12, 69,1 mg Nikotinamid, 20 mg Calpan (Calciumpantothenat), 400 mg Cholinchloride, 50 mg Eisen, 15 mg Kupfer, 100 mg Mangan, 70 mg Zink, 1,56 mg Iod, 0,25 mg Selen; weitere Bestandteile des Premix sind Tabelle 48 im Anhang zu entnehmen (MIAVIT GmbH; Essen, Deutschland); ³ die Aminosäuren L-Lysin, L-Threonin und L-Valin wurden von der Firma Evonik Degussa GmbH (Essen, Deutschland) bezogen

Tabelle 2: Nährstoffgehalte der Basisration in der Starter- (1.-11. Tag), Grower- (12.-21. Tag) und Finisher- (22.-35. Tag) Phase (in % TM)¹

	Starter %	Grower %	Finisher%
ME (MJ/kg TM)	14,26	14,59	14,57
TM	89,3	87,5	86,2
in % TM			
Rohprotein	29,9	24,3	23,3
Rohfett	6,81	8,99	9,65
Rohfaser	3,63	4,47	4,66
Rohasche	7,02	6,69	7,71
Aminosäuren			
Methionin	0,42	0,35	0,32
Methionin + Cystein	0,89	0,74	0,69
Lysin	1,62	1,38	1,3
Threonin	1,11	0,93	0,89
Arginin	1,68	1,48	1,53
Isoleucin	1,17	1,01	1,02
Leucin	2,62	2,10	1,89
Valin	1,31	1,14	1,12
Histidin	0,68	0,58	0,58
Phenylalanin	1,47	1,22	1,18
Glycin	1,09	0,96	0,96
Serin	1,4	1,16	1,11
Prolin	1,87	1,51	1,33
Alanin	1,45	1,20	1,07
Asparagin	2,58	2,28	2,31
Glutaminsäure	5,63	4,62	4,45

¹ TM, Rohasche, Rohfaser und Rohfett der Rationen wurden aus den Mittelwerten der 7 Versuchsgruppen in der JLU Gießen analysiert; Rohprotein und Aminosäurekonzentrationen wurden aus der Basisration von Evonik analysiert

Tabelle 3: Analyisierte DLM- bzw. MHA-Konzentration (% der TM) in den Rationen der sieben Versuchsgruppen

Gruppe	Starter			Grower			Finisher		
	Met	MHA ²	Met eq ³	Met	MHA	Met eq	Met	MHA	Met eq
Kontrolle	0,43	-	0,43	0,35	-	0,35	0,32	-	0,32
DLM 0,10	0,54	-	0,54	0,44	-	0,44	0,44	-	0,44
DLM 0,25	0,71	-	0,71	0,62	-	0,62	0,57	-	0,57
DLM 0,40	0,87	-	0,87	0,75	-	0,75	0,73	-	0,73
MHA 0,10 ¹	0,43	0,11	0,54	0,36	0,11	0,46	0,32	0,12	0,43
MHA 0,25 ¹	0,45	0,26	0,71	0,36	0,28	0,64	0,32	0,27	0,59
MHA 0,40 ¹	0,44	0,45	0,89	0,36	0,45	0,80	0,32	0,48	0,80

¹ da der Methioningehalt des MHA-Produktes nur 51,6 % beträgt (56,6% MHA-Produkt im Produkt/ Sipernat-Mix und 88% Wasser im MHA-Produkt), wurde 0,19 %, 0,49 % und 0,78 % des MHA-Produktes zugesetzt, um eine äquimolare Methioninkonzentration mit dem DLM zu erhalten;
² MHA-Zugabe in der TM; ³ die nicht-gerundeten Werte von Met und MHA wurden addiert; Met= Methionin

4.3 Datenerhebung der Leistung

Während der Versuchsdauer wurden die Futtermengen sowie die Tiergewichte jeweils nach den Fütterungsphasen (Starter, Grower und Finisher) erhoben. Die Stalltemperatur wurde kontinuierlich aufgezeichnet und kontrolliert, um eine Beeinflussung der Tiere durch Temperaturstress zu vermeiden. Die Tierverluste wurden je Mastabschnitt und Käfig erfasst.

Die Broiler wurden am Tag der Einstellung (Tag 0) gewogen und entsprechend ihres Gewichtes gleichmäßig auf die Käfige verteilt, so dass keine signifikanten Unterschiede in den durchschnittlichen Anfangsgewichten pro Gruppe entstanden. Nach Tag 10, Tag 21 und Tag 35 wurden die Lebendgewichte ermittelt und die durchschnittliche tägliche Zunahme pro Tier berechnet.

Die verbrauchte Futtermenge wurde je Käfig bestimmt. Dafür wurde das tägliche Gewicht des Futters notiert und die nicht verbrauchte Futtermenge am nächsten Tag zurückgewogen. Zusammen mit den ermittelten Gewichtszunahmen nach jeder Phase und der Futteraufnahme je Mastphase konnte die Futterverwertung für jeden Käfig berechnet werden.

4.4 Probengewinnung

Die Tötung der Tiere wurde durch Betäubung und anschließendes Entbluten fachgerecht durchgeführt. Die Schlachtung erfolgte randomisiert nach Behandlungsgruppen und das Gewicht der ausgewählten Broiler war repräsentativ für den jeweiligen Käfig, in dem er saß. Nach der Starter-Phase (Tag 10) und der Grower-Phase (Tag 21) wurde je ein Tier pro Käfig und nach der Finisher-Phase (Tag 35) 2-3 Tiere pro Käfig geschlachtet und beprobt. Das entsprach in jedem Durchgang ca. 63 Tieren und insgesamt 191 Broilern, die getötet und beprobt wurden. Von den restlichen Tieren wurden lediglich die Leistungsdaten aufgezeichnet, so dass am Ende von allen 336 Versuchstieren Leistungsdaten vorlagen.

Die Schlachtkörper wurden gerupft, die Ständer und der Kopf abgetrennt und anschließend gewogen (Schlachtkörpergewicht). Nach der Entnahme der inneren Organe (Darmtrakt, Leber, Milz und Herz) erfolgte eine erneute Wiegung mit Kropf und Niere (Schlachtgewicht).

Bei der Schlachtung wurden Proben von Plasma, Leber, Niere, Jejunummucosa und Brustmuskel in ausreichender Menge entnommen, um diese in den anschließenden Analysen untersuchen zu können. Im Folgenden wird die Probenentnahme der Gewebe im Detail beschrieben.

Für die Auslösung der Brustmuskeln wurde der Schlachtkörper mit dem Bürzel nach oben aufgestellt und die Rippen im Bereich der Gelenke bis zum Schultergelenk durchtrennt. Das Bruststück wurde nach vorne weggeklappt und die Sehne am Schultergelenk mit einem Messer durchschnitten. Beide Brustmuskeln wurden dann herauspräpariert, gewogen und der jeweils linke beprobt.

Bei der Entblutung der Schlachtkörper wurde das Blut in einem heparinisierten Röhrchen aufgefangen und bei 900 x g für 10 Min zentrifugiert (Heraeus™ Fresco™ 21 Mikrozentrifuge; Thermo Fisher Scientific, Osterode Deutschland). Das gewonnene Plasma wurde mit einer Pipette in mehrere 1,5 ml-Tubes (Eppendorf AG, Hamburg Deutschland) überführt und für die Analyse der TBA-RS, PC, GSH und Tocopherol bei -80°C eingefroren.

Nach der Entblutung wurde die Leber vollständig entnommen. Dazu wurde der Schlachtkörper von kaudal eröffnet. Das Gewicht der Leber wurde aufgezeichnet und

das Organ in einige größere Stücke zerteilt. Die Leberstücke wurden in ein Greiner-Röhrchen (15 ml) (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen Deutschland) überführt, sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Für die Analysen im Nierengewebe wurde je eine drei-lappige Niere aus der Karkasse präpariert und in 2 ml-Tubes bzw. nach der Finisher-Phase in Greiner-Röhrchen überführt. Das Gewicht der rechten Niere wurde erfasst. Die Niere wurde sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Gewinnung der Jejunummucosa wurde der Gastrointestinaltrakt aus dem Schlachtkörper präpariert, der Dünndarm separiert und das Jejunum abgetrennt. Das Jejunum wurde mit 0,9 % NaCl-Lösung gespült, leicht abgetrocknet und das Gewicht erfasst. Anschließend wurde das Jejunum durch einen Längsschnitt geöffnet, der restliche Inhalt vollständig entfernt und mit einem Spatel vom letzten Drittel des Darmabschnittes die Mucosa abgeschabt. Die Jejunummucosa wurde in 2 ml-Tubes überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert.

Zusätzlich wurden nur nach der Finisher-Phase auch das Gewicht des gespülten Jejunums sowie das Gewicht des abdominalen Fettgewebes erfasst.

4.5 Methoden der Laboranalytik

4.5.1 Probenvorbereitung

Das Leber- und Nierengewebe sowie die Jejunummucosa wurden für die Messung der PC, des GSH und der Enzyme GPx, SOD und CAT in gleicher Weise vorbereitet und anschließend analysenspezifisch nachverdünnt.

Folgende Materialien und Puffer wurden hierfür verwendet.

Tabelle 4: Materialien und Puffer zur Vorbereitung der Proben

Waage	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Eppendorf-Tubes® (2 ml und 1,5 ml)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
TissueLyser	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
Heraeus™ Fresco™ 21 Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific (Osterode, Deutschland)
Magnetrührer IKA® RCT Classic	IKA-Werke® (Staufen, Deutschland)
50mM Phosphatpuffer, pH 7,5	25 mM KH ₂ PO ₄ , 25 mM Na ₂ PO ₄ ,
Einwaage für 1000 ml	3,402 g KH ₂ PO ₄ , 3,549 g Na ₂ HPO ₄ ad 1000 ml mit Aqua bidest

Das Probenmaterial wurde auf ca. 0,25 g (Leber und Niere) bzw. 0,2 g (Jejunummucosa) in ein 2 ml Eppendorf-Tube eingewogen. Das Leber- und Nierengewebe wurde dann mit 1 ml, die Jejunummucosa mit 0,8 ml 50 mM Phosphatpuffer versetzt und im TissueLyser homogenisiert (20 Hz, 6 Min). Anschließend wurde das Homogenat bei 16200 x g und 4°C für 10 Min zentrifugiert, ca. 0,9 ml Überstand abpipettiert und bei -80°C eingefroren.

4.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Proteinbestimmung wurde das Probenmaterial entsprechend 4.5.1 vorbereitet und folgendermaßen nachverdünnt (Tabelle 5). Die verwendeten Materialien sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 5: Nachverdünnung für die Proteinbestimmung

Gewebe	Nachverdünnung mit 50 mM Phosphatpuffer
Leber	1:120
Niere	1:120
Jejunum	1: 70

Tabelle 6: Reagenzien und Geräte zur Bestimmung des Proteingehaltes

BCA Protein Quantitation Kit	Interchim (Montlucon, Frankreich)
Greiner 96-Well Platte	Sarstedt AG & Co, (Nümbrecht, Deutschland)
Heraeus™ Inkubator	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Plattenreader TECAN Infinite® M200	TECAN Austria GmbH (Grödig, Österreich)

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte mittels *BCA Protein Quantitation Kit* und basiert auf einer quantitativen, kolorimetrischen Messung. Cu^{2+} (in BCA-Reagenz B enthalten) wird hierbei durch Proteine in einem alkalischen Medium zu Cu^+ reduziert. Das Cu^+ - Ion bildet wiederum einen Farbkomplex mit BCA (in BCA-Reagenz A enthalten), dessen Absorption bei 562 nm gemessen werden kann. Die Absorption ist direkt proportional zur Proteinkonzentration.

Zur Anfertigung der Kalibrationsgerade wurde eine BSA-Standard-Lösung (2 mg/ml) verwendet. Die Herstellung der Reaktionslösung erfolgte durch Mischung von 50 Teilen Reagenz A und 1 Teil Reagenz B. Anschließend wurden 25 µl Probe mit 200 µl Reaktionslösung versetzt, 30 Min bei 37°C inkubiert und dann ein Absorptionsscan im *TECAN* durchgeführt. Folgende Einstellungen waren dafür nötig (Tabelle 7).

Tabelle 7: Geräteeinstellungen für den Tecan infinite M200 für die Messung der Proteinkonzentration

Parameter	Einstellungen
Platte	Greiner 24 Flat Bottom Transparent Polystyrol
Programm	Tecan i-control
Modus	Absorptionsscan
Schritt	1
Wellenlänge	450 nm – 595 nm
Anzahl der Blitze	5
Ruhezeit	3 ms

Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mit den Extinktionswerten bei 562 nm anhand der Eichgeraden.

4.5.3 Bestimmung der Glutathionkonzentration

Für die Messung der Glutathionkonzentration wurde das Probenmaterial entsprechend 4.5.1 vorbereitet. Das oxidierte Glutathion (GSSH) wurde ohne Nachverdünnung in dem hergestellten Homogenat gemessen. Für die Messung des Gesamtglutathion wurden die Proben folgendermaßen mit Puffer A (Tabelle 9) nachverdünnt.

Tabelle 8: Nachverdünnung für die Glutathion-Messung

Gewebe	Nachverdünnung mit Puffer A für die Gesamtglutathion-Messung
Leber	1:10
Niere	1:1
Jejunum	1: 5

Die verwendeten Reagenzien, Puffer und Geräte für diese Analyse sind Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: Reagenzien, Puffer und Geräte für die Glutathion-Messung

2-Vinylpyridin	Sigma- Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
10 (w/v) % Sulfosalicylsäure	Sigma- Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
DTNB (Ellmans-Reagenz)	Carl Roth GmbH, (Karlsruhe, Deutschland) 6 mM in Puffer C gelöst
EDTA	Sigma- Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Glutathion-Reduktase	Sigma- Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
GSSH- Standard	Sigma- Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Halbmikroküvetten	Sarstedt AG & Co, (Nümbrecht, Deutschland)
KH ₂ PO ₄	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
NADPH	GERBU Biotechnik GmbH (Heidelberg, Deutschland) 0,28 mM in Puffer-C gelöst
Na ₂ HPO ₄	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
PO ₄ -Puffer A	75 mM KH ₂ PO ₄ , 75 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,5
PO ₄ -Puffer C	62,5 mM KH ₂ PO ₄ , 62,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 6,3 mM EDTA pH 7,5
Triethanolamin, 50 (v/v) %	Sigma- Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Varian Cary® 50 Bio UV-Vis Spectrophotometer	Varian GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Vortex Genius 3	IKA®-Werke GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland)

Die Messung des Glutathions beruht auf der enzymatischen Bestimmung von Gesamtglutathion und oxidiertem Glutathion nach Tietze (1969) und Griffith (1980).

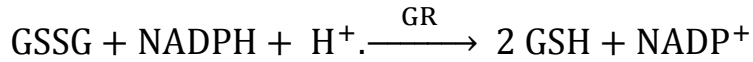
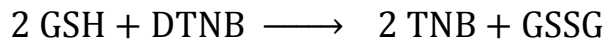


Abbildung 14: Prinzip der enzymatischen Messung von Glutathion

Das hierbei verwendete Ellmans-Reagenz (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure; DTNB) oxidiert das GSH zu GSSG und es entsteht der gelbe Farbstoff TNB, der bei 412 nm photometrisch nachgewiesen werden kann. Das GSSG wird durch Glutathion Reduktase (GR) unter NADPH + H⁺- Verbrauch zu GSH reduziert (Abbildung 14). Dieses kann dann erneut Wasserstoff auf DTNB übertragen.

Um den Anteil des oxidierten Glutathions zu messen, wird das GSH mit 2-Vinylpyridin derivatisiert. Das Produkt kann an keiner der ablaufenden Reaktionen teilnehmen und somit wird nur der Anteil des GSSH bestimmt. Der Gehalt an GSH wird anschließend aus der Differenz des Gesamtglutathion und des GSSG berechnet.

Für die Messung wurde zunächst eine Kalibrationsgerade mit dem GSSG-Standard und dem PO₄- Puffer A in 2 Schritten erstellt. Im ersten Schritt wurde 0,02 g Standard in 1 ml PO₄- Puffer A gelöst und anschließend 1:100 verdünnt, so dass ein Stamm von 200 µg/ml entstand. Im zweiten Schritt wurde aus diesem Stamm eine Kalibrationsreihe mit aufsteigender Konzentration pipettiert. Die Standards wurden wie die Proben nach der folgenden Beschreibung behandelt, gemessen und aus den Konzentrationen (µg/ml) und den gemessenen Extinktionsänderungen pro Minute wurde eine Kalibrationsgerade erstellt (Abbildung 15).

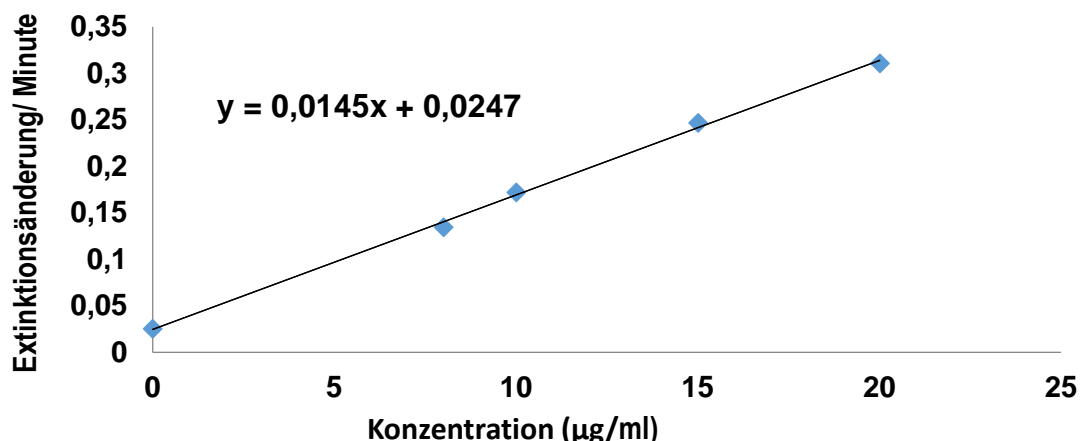


Abbildung 15: Beispielhafte Kalibrationsgerade zur Berechnung der Glutathionkonzentration. Es ist die Kalibrationsgerade zur Berechnung der Glutathionkonzentration im Lebergewebe dargestellt. Der Graph stellt die Konzentration der verwendeten Standards (µg/ml) und die entsprechende Extinktionsänderung pro Minute dar.

Zur Proteinfällung wurde den Proben im Verhältnis 1:1 Sulfosalicylsäure (Gesamtmenge mindestens 800 µl) zugegeben und mit dem Vortex Genius 3 gut geschüttelt. Die gefällten Proben wurden 10 Min auf Eis gekühlt und anschließend bei 4°C und 16200 x g für 10 Min zentrifugiert. Von dem erhaltenen Überstand (Cytosol) wurden für beide Messungen je 270 µl abgenommen und nach dem Schema in Tabelle 10 für die Messung vorbereitet.

Tabelle 10: Pipettierschema für Proben und Standards zur Vorbereitung der Glutathion-Messung

	Standard (µl)	Cytosol (µl)	Puffer-A (µl)	Triethanolamin (µl)	2-Vinylpyridin (µl)
Standard 1-10	270	-	20	30	-
Gesamtglutathion-Messung	-	270	20	30	-
GSSG-Messung	-	270	-	30	20

Alle Gemische wurden auf dem Vortex Genius 3 gut geschüttelt und die Proben der GSSG-Messung 30 Min unter dem Abzug inkubiert.

Für die Messung wurden die Proben bzw. Standards mit den nötigen Reagenzien nach dem Schema in Tabelle 11 in Halbmikroküvetten pipettiert. Nach der Zugabe der

GSH- Reduktase wurden die Reagenzien mit dem Rührspatel vermischt und sofort im *Cary® 50 Bio* gemessen. Die Messung erfolgte bei 412 nm im Kinetik-Programm. Die Extinktionsänderung wurde über 3 Min aufgezeichnet, wobei alle 25 Sek eine Messung stattfand.

Tabelle 11: Pipettierschema für die Glutathion-Messung

	Standard-Gemisch (µl)	Cytosol-Gemisch (µl)	Puffer-A (µl)	NADPH (µl)	DTNB (µl)	GSH-Reduktase (µl)
Standard 1-10	75			350	50	25
Proben		75		350	50	25
Blindwert			75	350	50	25

Mit dem Wert $\Delta E / \text{Min}$ (Extinktionsänderung pro Minute) wurde anschließend die Konzentration an Glutathion anhand der Kalibrationsgerade berechnet.

4.5.4 Bestimmung der Glutation-Peroxidase-Aktivität

Für die Bestimmung der GPx-Aktivität wurde das Probenmaterial entsprechend 4.5.1 vorbereitet und folgendermaßen nachverdünnt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Nachverdünnung für die Messung der GPx-Aktivität

Gewebe	Nachverdünnung mit 50mM Phosphatpuffer
Leber	1:40
Niere	1:20
Jejunum	1:10

Die verwendeten Reagenzien und Geräte für diese Analyse sind Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13: Reagenzien, Puffer und Geräte zur Bestimmung der GPx-Aktivität

Cumene hydroperoxide	Sigma- Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) 114 µl in 25 ml Aqua bidest
EDTA	Sigma- Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Glutathion reduziert (GSH)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Glutathion-Reduktase	Sigma- Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Halbmikroküvetten	Sarstedt AG & Co, (Nümbrecht, Deutschland)
50 mM Kaliumphosphatpuffer	25 mM KH_2PO_4 , 25 mM KH_2PO_4 , 5 mM EDTA pH 7,0
Kaliumphosphat-„Messpuffer“	41,75 mM KH_2PO_4 , 41,75 mM K_2HPO_4 , 8,35 mM EDTA pH 7,0
K_2HPO_4	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
KH_2PO_4	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
NADPH	GERBU Biotechnik GmbH (Heidelberg, Deutschland)
NaN_3 -Lösung	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland) 13 mM in Aqua bidest gelöst
Reaktionsmix	0,1 mM NADPH (= 0,004165 g) 1 mM GSH (= 0,015365 g) 2 mM NaN_3 (= 8 ml) 1 U/ml GR (= 18 µl) * ad 50 ml „Messpuffer“
Varian Cary® 50 Bio UV-Vis Spectrophotometer	Varian GmbH (Darmstadt, Deutschland)

* µl der GR ist abhängig von der Aktivität. Diese ist individuell je nach Lieferung.

Die Bestimmung der GPx-Aktivität wurde nach der Methode von Lawrence und Burk (1976) durchgeführt. Sie beruht darauf, dass reduziertes Glutathion (GSH) Wasserstoff auf Hydroperoxide übertragen kann, wobei es selbst zu GSSG oxidiert und Wasser entsteht. Die Reaktion wird durch die GPx katalysiert. Das entstandene GSSG wird anschließend durch die Glutathion-Reduktase in Anwesenheit von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ wieder zu GSH reduziert (Abbildung 16). Da dem Reaktionsansatz alle Reagenzien im

Überschuss zugesetzt wurden, bestimmt allein die Glutathion-Reduktase die Reaktionsgeschwindigkeit. Das reduzierte NADPH, welches bei 340 nm Licht absorbiert, wird im Laufe der Reaktion zu NADP⁺ oxidiert. NADP⁺ weist keine Extinktion bei 340 nm auf. Somit entsteht eine negative Enzymkinetik.

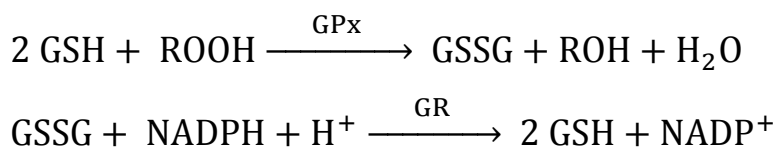


Abbildung 16: Prinzip der Messung der GPx-Aktivität

Für die Messung wurde der Reaktionsmix aus Tabelle 13 hergestellt und zusammen mit der Probe nach dem Schema in Tabelle 14 in Halbmikroküvetten pipettiert. Durch die Zugabe des Cumene hydroperoxide wurde die Reaktion gestartet und die Extinktionsabnahme mit dem Kinetik-Programm im *Cary® 50 Bio* über einen Zeitraum von 2 Min aufgezeichnet, wobei alle 25 Sekunden eine Messung stattfand.

Tabelle 14: Pipettierschema zur Messung der GPx-Aktivität

	Reaktionsmix (µl)	Probe (µl)	50 mM K-P- Puffer	Cumene hydroperoxid
Blindwert	450	-	25	25
Probe	450	25	-	25

Unter Verwendung der folgenden Formel (Abbildung 17), konnte die Aktivität der GPx in U/l berechnet werden. Die Aktivität wurde anschließend auch auf den Proteingehalt bezogen.

$$U/l = \frac{\Delta E / \text{min} * V_G * V}{\epsilon * v * d}$$

Abbildung 17: Formel zur Berechnung der Enzymaktivität von GPx. $\Delta E/\text{min}$ = $\Delta E/\text{min}$ der Probe - $\Delta E/\text{min}$ des BW, V_G = Gesamtvolumen der Küvette (ml), V = Verdünnung des Homogenats, ϵ = spezifischer Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm (0,00622 L/ $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$), v = Volumen der Probe im Test (ml), d = Schichtdicke der Küvette (cm)

4.5.5 Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität

Für die Bestimmung der SOD-Aktivität wurde das Probenmaterial entsprechend 4.5.1 vorbereitet. Eine Nachverdünnung war für diese Analyse nicht notwendig.

Die verwendeten Reagenzien, Puffer und Geräte für diese Analyse sind Tabelle 15 zu entnehmen.

Tabelle 15: Reagenzien, Puffer und Geräte für die Bestimmung der SOD- Aktivität

24- Well Advanced TC™ Platte	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich)
Bernsteinsäure- Lsg. (0,05 mol/l) Einwaage für 100 ml	Merck, Darmstadt 50 mmol ad 100 ml mit Aqua bidest
EDTA	Sigma- Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Plattenreader TECAN Infinite® M200	TECAN Austria GmbH (Grödig, Österreich)
Pyrogallol (23,8 mmol/l)	Merck (Darmstadt, Deutschland) 2,38 mmol Pyrogallol ad 100 ml Aqua bidest
SOD aus bovinen Erythrozyten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Schnelldorf, Deutschland)
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Tris-Succinat-Puffer (0,05 mol/l)	50 mmol Tris, 1 mmol EDTA in Aqua bidest lösen, mit der Bernsteinsäure- Lsg. auf pH 8,2 einstellen; ad 100 ml Aqua bidest

Die SOD katalysiert die Umwandlung von Superoxidradikalen in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff (McCord & Fridovich 1969) (Abbildung 18).

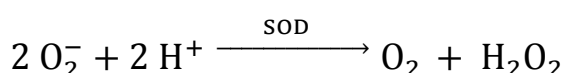


Abbildung 18: Prinzip von SOD als Katalysator von Sauerstoffradikalen

Die SOD-Gesamtaktivität wurde nach der Methode von Marklund und Marklund (1974) gemessen. Die durchgeführte Absorptionsmessung basiert auf der Hemmung der Autooxidation des Pyrogallols durch die SOD.

Die SOD wurde zunächst in sterilem H₂O gelöst, so dass eine Konzentration von 5000-6000 U/ml entstand. Aus dieser Lösung wurde dann mit dem Tris-Succinat-Puffer eine Standardreihe erstellt.

In einer 24-Well Platte wurden 700 µl Tris-Succinat-Puffer mit 25 µl Standard, Probe bzw. Aqua bidest für den Blindwert gemischt und für 10 Min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden 25 µl Pyrogallol hinzugegeben, im *TECAN* geschüttelt (Dauer: 10 Sek., Amplitude: 3 mm) und die Messung sofort gestartet. Hierfür wurde folgende Einstellung genutzt (Tabelle 16).

Tabelle 16: Geräteeinstellung des Tecan infinite M200 zur Messung der SOD- Aktivität

Parameter	Einstellungen
Platte	Greiner 24 Flat Bottom Transparent Polystyrol
Programm	Tecan i-control
Modus	Absorption – Kinetik-Messung
Intervallzeit	00:01:00
Kinetik-Zyklen	5
Wellenlänge	420 nm
Bandbreite	9 nm
Anzahl der Blitze	16
Ruhezeit	0 ms

Aus den erhaltenen Messdaten wurde der Absorptionsanstieg pro Minute berechnet und zur Berechnung der SOD-Aktivität (U/ml) die Gleichung der Kalibrationsgerade benutzt. Aus dem Blindwert auf jeder Platte wurde ein Korrekturfaktor berechnet, um die Variation der einzelnen Messungen auszugleichen. Die SOD-Aktivität wurde außerdem auch auf den Proteingehalt bezogen.

4.5.6 Bestimmung der Katalase-Aktivität

Für die Bestimmung der CAT-Aktivität wurde das Probenmaterial entsprechend 4.5.1 vorbereitet und folgendermaßen nachverdünnt (Tabelle 17).

Tabelle 17: Nachverdünnung für die Messung der Katalase-Aktivität

Gewebe	Nachverdünnung mit 50mM Phosphatpuffer
Leber	1:700
Niere	1:500
Jejunum	1: 500

Die verwendeten Reagenzien und Geräte für diese Analyse sind Tabelle 18 zu entnehmen.

Tabelle 18: Reagenzien und Geräte zur Bestimmung der Katalase-Aktivität

Plattenreader TECAN Infinite® M200	TECAN Austria GmbH (Grödig, Österreich)
UV-Star® Mikroplatte 96-Well	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Wasserstoffperoxid (30%ige Lösung)	VWR International (Darmstadt, Deutschland)

Die Enzymaktivität der CAT wurde nach der Methode von Aebi (1983) gemessen. Die Messung basiert auf dem Abbau von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser (Abbildung 19). Die Zersetzung von H_2O_2 wird über die Extinktionsabnahme bei 240 nm gemessen.

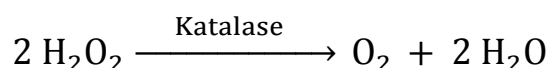


Abbildung 19: Prinzip von Katalase als Katalysator für Wasserstoffperoxid

Da Wasserstoffperoxid nicht stabil ist, wurden erst kurz vor der Messung 0,2 ml der 30%igen H_2O_2 -Lösung mit 50 mM Phosphatpuffer auf 50 ml aufgefüllt und in einer dunklen Flasche auf Eis gelagert. 120 μl der Probe wurde jeweils in die Kavitäten der Mikroplatte pipettiert und die Reaktion mit 60 μl H_2O_2 -Lösung gestartet. Die Absorptionsmessung erfolgte im *TECAN* bei 25°C mit folgender Einstellung (Tabelle 19).

Tabelle 19: Geräteeinstellungen des Tecan infinite M200 für die Messung der Katalase-Aktivität

Parameter	Einstellungen
Platte	Greiner 96 Flat Bottom Transparent Polystyrol
Programm	Tecan i-control
Modus	Absorption – Kinetik-Messung
Intervallzeit	00:00:12
Kinetik-Zyklen	12
Wellenlänge	240 nm
Bandbreite	5 nm
Anzahl der Blitze	15
Ruhezeit	0 ms
Bereich der Platte	A1 – G1

Mit der Formel in Abbildung 20 konnte die Aktivität der CAT in Units pro Liter (U/l) berechnet werden. Die Aktivität wurde anschließend auch auf den Proteingehalt bezogen.

$$U/l = \frac{\Delta A / \text{min} * V_G * V}{\epsilon * v * d}$$

Abbildung 20: Formel zur Berechnung der Katalase-Aktivität. ΔA = Absorptionsänderung, V_G = Gesamtvolumen der Küvette (ml), V = Verdünnung des Homogenats, ϵ = spezifischer Extinktionskoeffizient von Wasserstoffperoxid bei 240 nm (0,0436 L/mmol*cm), v = Volumen der Probe im Test (ml), d = Schichtdicke der Küvette (cm)

4.5.7 Bestimmung der Proteincarbonyle

Zur Bestimmung der PC wurde das Protein *Carbonyl Content Assay Kit* von *Sigma Aldrich* verwendet und nach dessen Anleitung durchgeführt. Bei der Oxidation von Proteinen durch reaktive Sauerstoffspezies entstehen Carbonylgruppen, die zur Bestimmung der oxidativen Schädigung genutzt werden können. Die Messung dieser Carbonylgruppen basiert auf der Derivatisierung mit 2,4- Dinitrophenylhydrazin (DNPH). Das entstehende DNP kann photometrisch bei 375 nm nachgewiesen

werden und verhält sich proportional zu den vorhandenen Carbonylen (Assay Kit Produkt Information).

Das verwendete Kit sowie die Puffer und Geräte sind Tabelle 20 zu entnehmen.

Tabelle 20: Kits, Puffer und Geräte für die Messung der Proteincarbonyle

Azeton	Höfer Chemie GmbH (Sulzbach, Deutschland)
Protein Carbonyl Content Assay Kit	Sigma Aldrich (USA)
Plattenreader TECAN Infinite® M200	Plattenreader TECAN Infinite® M200
Sonorex Ultraschallbad	BRANDELIN electronic GmbH (Berlin, Deutschland)
1x PBS pH 7,4	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 2 mM KH ₂ PO ₄ , 10 mM Na ₂ HPO ₄

Die PC wurden im Lebergewebe und im Plasma gemessen. Für die Durchführung des Assays ist laut Kit-Information eine Proteinkonzentration der Proben von ca. 10 mg/ml (5-20 mg/ml) notwendig. Hierzu wurde je 0,025 g Lebergewebe eingewogen, mit 250 µl PBS homogenisiert und wie in 4.5.1 beschrieben homogenisiert. 100 µl des Überstandes wurde für die Messung verwendet. Die Plasmaproben wurden aufgetaut und 1:3 mit sterilem H₂O verdünnt, um die benötigte Proteinkonzentration zu erhalten. Die Messung der Proteinkonzentration wurde, wie in Kapitel 4.5.2 beschrieben, durchgeführt. Die Reagenzien wurden laut Anleitung des Herstellers vorbereitet und gelagert. Wichtig war hierbei die identische Chargennummer der Kits zu verwenden, da es ansonsten zu abweichenden Ergebnissen kam.

Das Assay beginnt mit der Zugabe von 10 µl Streptococin zu 100 µl Leberhomogenat. Nach 15- minütiger Inkubation wurde die Probe 5 Min bei 13000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Tube überführt. Danach wurden erst 100 µl DNPH- Lösung zugegeben und 10 Min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 30 µl 100%ige TCA-Lösung zugefügt und gut geschüttelt. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben bei 13000 x g und 4°C für 2 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann entfernt ohne das entstandene Pellet zu zerstören und dieses wurde danach mit 500 µl Azeton und mit Hilfe von Ultraschallbad und dem Vortex Genius 3 gelöst. Anschließend wurde die Probe für 5 Min bei -20°C im Kühlblock inkubiert, bei

13000 x g und 4°C für 2 Min zentrifugiert und das Azeton wieder entfernt, ohne das Pellet zu beschädigen. Der Waschschrift mit Azeton wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Im nächsten Schritt wurde je 200 µl 6 M Guanidin-Lösung auf die Pellets gegeben und in das Ultraschallbad gestellt bis sich die Pellets vollständig gelöst hatten. 100 µl jeder Probe wurde dann auf die 96- Well- Platte pipettiert und die Absorption bei 375 nm im *TECAN* gemessen. Folgende Einstellungen wurden dafür verwendet (Tabelle 21).

Tabelle 21: Geräteeinstellung des Tecan infinite M200 zur Messung der Proteincarbonyle

Parameter	Einstellungen
Platte	Greiner 96 Flat Bottom Transparent Polystyrol
Programm	Tecan i-control
Modus	Absorption
Wellenlänge	375 nm
Bandbreite	9 nm
Anzahl der Blitze	12 Stk.
Ruhezeit	0 ms

Die PC im Plasma wurden auf gleiche Weise gemessen, jedoch war der erste Streptococin- Schritt hierfür nicht nötig.

Nach der Durchführung des PC- Assays wurde die Proteinkonzentration erneut bestimmt, da durch die verschiedenen Waschschriffe ein erheblicher Teil der Proteine verlorengegangen war. Die PC wurden im Ergebnisteil im Verhältnis zum Gesamtprotein (nmol/mg Protein) dargestellt.

4.5.8 Bestimmung der Triglyceride

Die Bestimmung der Triglyceride (TG) wurde im Leber- und Nierengewebe, in der Jejunummucosa und im Plasma durchgeführt. Da die TG im Probenmaterial zusammen mit dem Reagenz *Fluitest® TG* einen Farbkomplex bilden, der bei 500 nm photometrisch messbar ist, konnte der Gehalt an TG im Photometer *Cary® 50 Bio* gemessen werden. Anhand der Extinktionswerte der Probe, des Blindwertes und des Standards konnte mit Hilfe folgender Formel (Abbildung 21) die Menge an TG in mg/ g Gewebe berechnet werden.

$$\text{TG (mg/g)} = \frac{\Delta \text{Ex}_{\text{Probe}} * c_{\text{Std}}(\mu\text{g}) * \text{Vol}(\mu\text{l})}{\Delta \text{Ex}_{\text{Std}} * E(\text{g}) * V_{\text{Probe}}(\mu\text{l}) * 1000}$$

Abbildung 21: Formel zur Berechnung der Triglyceridgehalte. $\Delta \text{Ex}_{\text{Probe}}$ = Extinktion der Probe minus Extinktion des BW, $\Delta \text{Ex}_{\text{Std}}$ = Extinktion des Standards minus Extinction des BW, c_{Std} = Konzentration des Standards, Vol= Volumen, E= Einwaage, V_{Probe} = Verdünnung der Probe

Die verwendeten Geräte und Reagenzien für diese Analyse sind Tabelle 22 zu entnehmen.

Tabelle 22: Geräte und Reagenzien für die Bestimmung der Triglyceride

Contronorm® Plus	Analyticon® Biotechnologies (Lichtenfels, Deutschland)
Fluitest® TG Reagenz	Analyticon® Biotechnologies (Lichtenfels, Deutschland)
Hexan	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Hexan-Isopropanol- Gemisch	Hexan und Isopropanol im Verhältnis 3:2 (v:v) gemischt
Isopropanol	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
TissueLyser	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
Varian Cary® 50 Bio UV-Vis Spectrophotometer	Varian GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Für die Messung der TG wurden die Gewebeproben von Leber, Niere und Jejunum folgendermaßen vorbereitet. Je 50 mg des Leber- bzw. Nierengewebes und der homogenisierten Jejunummucosa wurden in ein 2 ml-Tube eingewogen und mit 500 µl Hexan-Isopropanol-Gemisch (HIP) sowie einer Homogenisierungskugel versetzt und im TissueLyser für 6 Min bei 20 Hz homogenisiert. Nach der Homogenisierung erfolgte eine Behandlung im Ultraschallbad für 30 Min, um alle Gewebepartikel zu lösen. Anschließend wurden die Proben bei 15°C und 1900 x g für 10 Min. zentrifugiert und der entstandene Überstand mit einer Pipette in ein 1,5 ml-Tube überführt. Nach der Begasung mit Stickstoff wurden die Aufschlüsse bis zur Messung bei -20°C gelagert. Für die dreimalige Messung jeder Probe mussten zunächst von den Aufschlüssen

dreimal 10 µl (Leberproben) bzw. 15 µl (Nieren- und Jejunummukosaproben) in jeweils einem 1,5 ml-Tube unter Stickstoffbegasung bei 37°C abgedampft und in 25 µl reinem Isopropanol aufgenommen werden. Dieser Schritt war nötig, da das Hexan die Messergebnisse verfälschen würde.

Zur Bestimmung der TG-Gehalte im Plasma war keine Aufbereitung nötig. Die Gehalte konnten direkt im unbehandelten Plasma ermittelt werden. Hierfür wurden die Proben auf 25°C im Thermoblock erwärmt und kurz anzentrifugiert, damit kein ausgeflocktes Protein in die Analysemenge gelangte, welches die Messergebnisse hätte verfälschen können. Danach wurden je 10 µl der Plasmaprobe in drei 1,5 ml-Tubes pipettiert.

Sowohl die Plasmaproben als auch die abgedampften Leber-, Nieren- und Jejunumproben in Isopropanol wurden mit 500 µl *Fluitest® TG Reagenz* versetzt. Parallel wurden ein Kontrollserum (*Contronorm® Plus*), ein Blindwert und ein Standard je dreimal inkubiert (Tabelle 23). Beim Blindwert wurde, entsprechend der abgedampften Menge der Probe, HIP abgedampft und in 25 µl Isopropanol aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 15 Min im Thermoblock, bevor die Messlösungen in Halbmikroküvetten umgefüllt und bei 500 nm im *Cary® 50 Bio* Photometer gemessen wurden.

Tabelle 23: Pipettierschema für die photometrische Messung der TG-Gehalte in Leber, Niere, Jejunummucosa und Plasma

Reagenz	Blindwert	Standard	Kontrollserum	Proben
Probenvolumen	-	-	-	10 bzw 15 µl
Isopropanol zur Aufnahme	25 µl	-	-	25 µl
Abgedampftes HIP ¹	10 bzw. 15 µl	-	-	-
Contronorm® Plus	-	-	25µl	-
Fluitest® TG Reagenz	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
TG-Standard	-	25 µl	-	-

¹ Beim Blindwert wurde reines HIP abgedampft

4.5.9 Bestimmung der Tocopherole

Die Bestimmung der α- und γ-Tocopherole (Vitamin E) erfolgte mit Hilfe der *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) nach einer modifizierten Methode von Bieri et al. (1979) und Balz et al. (1993). Die Erfassung der Tocopherolgehalte basiert

auf einer Verseifung der Fette mit dem, darin gebundenen, fettlöslichen Vitamine E und der anschließenden Extraktion des Vitamins mittels Hexan.

Die verwendeten Geräte und Reagenzien für diese Analyse sind Tabelle 24 zu entnehmen.

Tabelle 24: Geräte und Reagenzien für die Bestimmung der Tocopherolgehalte

BHT-Methanol	0,05 g BHT in 100 ml Methanol gelöst
Butylhydroxytoluol (BHT)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH (Schnelldorf, Deutschland)
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol-Pyrogallol-Gemisch	1 g Pyrogallol in 100 ml Ethanol gelöst
NaOH (gesättigte Lösung)	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland) NaOH im Überschuss in Aqua bidest gelöst
n-Hexan	Th. Geyer GmbH (Höxter, Deutschland)
Pyrogallol	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)

Für die Analyse der Tocopherolgehalte mittels HPLC war eine Aufbereitung der Proben notwendig, da das Vitamin E in den Zellbestandteilen eingelagert ist. Hierzu wurden die Gewebeproben von Leber, Niere und Jejunummucosa im Dunkeln leicht angetaut und aus der Mitte der Probe eine entsprechende Menge in ein Glasröhrchen mit Stopfen eingewogen (siehe Tabelle 25). Zur Aufarbeitung des Plasmas wurden 200 µl verwendet. Es erfolgte die Zugabe von 2 ml Ethanol-Pyrogallol-Gemisch (EOH/Pyro) und 300 µl gesättigte NaOH-Lösung zum Probenmaterial. Anschließend wurde das Glasröhrchen mit Stickstoff begast und mit einem Stopfen und einer Klammersicherung verschlossen. Nach intensivem Durchmischen wurden die Proben für 30 Min. bei 70°C in einem Thermoblock verseift. Dann kühlten die Proben im Dunkeln ab, bevor 2 ml Hexan und 2 ml Aqua bidest hinzugegeben wurden. Nach einem erneuten kräftigen Schütteln erfolgte bei 1200 x g und 10°C für 5 Min eine Zentrifugation und ein erneutes Herunterkühlen der Proben auf Raumtemperatur im Dunkeln. Die entstandene Hexanphase wurde abgenommen und in einem 1,5- ml-Tube mit Stickstoff begast und bis zur Messung bei -20°C eingefroren.

Tabelle 25: Pipettierschema zur Bestimmung der Tocopherolgehalte in den einzelnen Geweben

Probe	Einwaage (g bzw. ml)	EOH/Pyro (ml)	NaOH (µl)	Hexan (ml)	Aqua bidest (ml)	Abnahme Hexan zum Abdampfen (ml)	Aufnahme MeOH/BHT (ml)
Leber	0,05	2	300	2	2	0,5	0,25
Niere*	0,05	2	300	2	2	0,5	0,25
Niere*	0,1	2	300	2	2	0,25	0,25
Jejunum	0,05	2	300	2	2	0,5	0,25
Plasma	0,2	2	300	2	2	0,2	0,25

* Es wurden unterschiedliche Einwaagen verwendet, da teilweise bei Einwaagen von 0,05 g die Gehalte an Tocopherol unterhalb der Kalibrationsgerade lagen

Am Messtag wurde die abgenommene Hexanphase langsam und im Dunkeln aufgetaut. Von dem Hexanaufschluss wurden adäquate Mengen abgenommen (siehe Tabelle 25) und unter Stickstoffbegasung bei 37°C abgedampft sowie anschließend in eine entsprechende Menge Methanol-BHT-Gemisch aufgenommen. Zum richtigen Aufnehmen des Methanol-BHT-Gemisches wurde kräftig geschüttelt. Davon füllte man 200 µl in Mikroinlays, die dann in das Rack des Autosamplers gestellt wurden. Die Messung erfolgte wie im Folgenden beschrieben.

Die HPLC ist eine Methode mit der man Substanzen, in diesem Fall Vitamin E, trennen kann. Für die Auftrennung sind eine stationäre Phase (Säule) und eine mobile Phase (Laufmittel) notwendig. Je größer die Wechselwirkung der untersuchten Substanz mit der stationären Phase desto länger dauert es bis sie durch das Fließmittel von der Säule eluiert wird. Die dadurch entstehenden Retentionszeiten der Tocopherole ermöglichen, dass nach einer bestimmten Zeit am Fluoreszenzdetektor nur eine Substanz ankommt und bei der entsprechenden Wellenlänge gemessen wird (siehe Tabelle 26). Zur Übersicht sind in Tabelle 27 alle technischen Daten und Einstellungen des HPLC aufgeführt.

Tabelle 26: Retentionszeiten, Kalibrationsbereiche und Wellenlängen für Tocopherole im HPLC

	Retentionszeiten	Kalibrationsbereiche	Wellenlängen
γ – Tocopherol	4,4 Min	0,004-0,15 µg/ml	295 nm
α – Tocopherol	5,0 Min	0,06-2,09 µg/ml	295 nm

Tabelle 27: Technische Daten und Einstellungen des HPLC zur Bestimmung der Tocopherolgehalte in Plasma, Leber, Niere und Jejunummucosa

Parameter	Einstellungen
Pumpe	L-7100 (LaChrom)
Säulenofen	L-7360 (LaChrom)
Autosampler	L-7200 (LaChrom)
Detektor	Fluoreszenzdetektor L-7485 (LaChrom)
Auswertung	EZ Chrom Elite Version 3.3.1
Säule	Phenomenex Luna 5u C18(2); 150*4, 6 mm (S/No 681886-19)
Vorsäule	Phenomenex
Fließmittel	MeOH
Probenschleife	100 µl
Injektionsvolumen	50 µl
Durchfluss	1,3 ml/Min
Druck	53 bar
Temp. Säulenofen	40°C
Analysezeit	6,6 min

Die Signale des Detektors wurden aufgezeichnet und in Flächeneinheiten umgerechnet. Mit Hilfe der ermittelten Flächeneinheiten von Probe, Blindwert und der Standards der Kalibrationsgerade sowie der Einwaage und der Verdünnung konnten anhand der Steigung und des Achsenabschnittes der Kalibrationsgerade die Tocopherolgehalte der Proben in µg/g (Gewebe) oder µg/ml (Plasma) ermittelt werden. Die Auswertung kann in der folgenden Formel (Abbildung 22) zusammengefasst werden. Die gemessenen Tocopherolisomere (α-, und γ-Tocopherol) wurden in den Ergebnissen als Gesamttocopherol angegeben, da die Konzentration des Gesamttocopherols als Maß der Vit- E-Aktivität dient. Den überwiegenden Anteil macht dabei das α-Tocopherol aus. Da das Vitamin E (Tocopherol) in fettlöslichen Strukturen vorkommt, wurden die gemessenen Vitaminkonzentrationen auf die TG- Konzentrationen bezogen und als relative Konzentration (µmol/g TG) dargestellt.

$$\mu\text{g/g bzw. } \mu\text{g/ml} = \frac{(\text{Fläche}_{\text{Probe}} * a + b) * V_{\text{Probe}}}{E \text{ (g)}}$$

Abbildung 22: Formel zur Berechnung der Tocopherolgehalte. Fläche_{Probe}= ermittelte Flächeneinheit der Probe; a= Steigung; b=Achsenabschnitt; V_{Probe}= Verdünnung der Probe; E= Einwaage der Probe in Gramm

4.5.10 Bestimmung der TBA-RS

Die Thiobarbitursäure reaktive Substanzen (TBA- RS) wurden im Plasma und im Leberhomogenat bestimmt. Für die Messung wurden die Leberproben folgendermaßen vorbereitet. 50 mg Leber wurde mit 500 µl 10 mM Tris-HCl-Puffer versetzt, mit N₂ begast und im TissueLyser für 6 Min und 20Hz homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat 10 Min bei 500 x g und 2°C zentrifugiert und ca. 250 µl des Überstandes in N₂-gespülte Tubes überführt. Das Homogenat wurde bei - 80°C gelagert. Das Plasma wurde direkt gemessen.

Die verwendeten Reagenzien, Puffer und Geräte für diese Analyse sind Tabelle 28 zu entnehmen.

Tabelle 28: Reagenzien, Puffer und Geräte für die Messung der TBA-RS

1,1,3,3-Tetraethoxy-Propan	Sigma- Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol/H ₂ O-Gemisch	420 ml Ethanol 96% ad 1000 ml mit Aqua bidest
Inkubationsbad 1083	GFL GmbH (Burgwedel, Deutschland)
Methanol	VWR International GmbH (Deutschland)
methanolische NaOH	9 ml 1 M NaOH ad 100 ml Methanol
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
ortho-Phosphorsäure (85%) (0,44 mol/l)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) 10 ml ortho-Phosphorsäure ad 1000 ml Aqua bidest
Thiobarbitursäure 0,6%ige TBA-Reagenz	Tokyo Chemical Industry (Japan) 0,6 g TBA ad 100ml Aqua bidest im Wasserbad lösen und auf Raumtemperatur abkühlen
Tris-HCl Puffer pH 7,4 0,44 mol/l	1,576 g TRIS-HCl in 900 ml H ₂ O lösen und mit 7,5 M KOH pH auf 7,4 einstellen ad 1000 ml Aqua bidest
Plattenreader TECAN Infinite® M200	TECAN Austria GmbH (Grödig, Österreich)

TBA- RS sind Produkte der Lipidperoxidation und somit ein Indikator für oxidativen Stress. Durch die Verbindung mit TBA bilden sie einen Farbkomplex und können somit durch eine Fluoreszenzmessung detektiert werden.

Da die Berechnung der TBA- RS-Konzentration anhand einer Kalibrationsgerade erfolgte, wurden als erstes Tetraethoxypropane (TEP)-Standards mit einem Ethanol/H₂O-Gemisch angesetzt. Aus einer 8,0245 mM Stammlösung A wurden 0,3 ml entnommen und mit 20 ml Ethanol/H₂O- Gemisch die 120,37 μ M Stammlösung B hergestellt. Um die Standardlösungen herzustellen, wurden verschiedene Volumina der Stammlösung B in jeweils 10 ml Ethanol/H₂O-Gemisch gelöst. Das Pipettierschema und die Konzentrationen sind Tabelle 29 zu entnehmen.

Tabelle 29: Pipettierschema zur Herstellung der Standards für die TBA-RS-Kalibrationsgerade

Standard	μ l Stammlösung B in 10 ml EOH/H ₂ O-Gemisch	Verdünnung	c (nmol/ml)
1	50	200	0,602
2	100	100	1,204
3	200	50	2,407
4	400	25	4,815
5	600	16,7	7,222

Die Proben wurden aufgetaut, das Leberhomogenat bei 16200 x g anzentrifugiert und nach dem Schema in Tabelle 30 in 1,5 ml- Tubes pipettiert. Die Tubes wurden auf dem Vortex Genius 3 gut geschüttelt, in einen Spezialständer eingespannt und nach 60- minütiger Inkubationszeit im Wasserbad (100°C) 10 Min auf Eis abgekühlt. Danach wurde jedem Tube 750 μ l methanolische NaOH zugegeben, erneut gut geschüttelt und zentrifugiert (10°C, 1500 x g, 10 Min). Anschließend wurden je 300 μ l pro Well in Dreifachbestimmung auf eine Analyseplatte pipettiert und direkt im *TECAN* gemessen. Die Standards wurden auf jeder Analyseplatte mitgemessen und die TBA- RS- Konzentration der Proben der entsprechenden Platte anhand der Eichkurve berechnet. Die Geräteeinstellungen für die Messung der TBA- RS ist Tabelle 31 zu entnehmen.

Tabelle 30: Pipettierschema für die Messung der TBA-RS

	Probe Leber	Probe Plasma	Standard	Blindwert
Leber	25 µl	-	-	-
Plasma	-	50 µl	-	-
Standard 1-5	-	.	25 µl	-
EOH/H ₂ O-Gemisch	-	-	-	25 µl
0,44 M H ₃ PO ₄	375 µl	375 µl	375 µl	375 µl
H ₂ O bidest	225 µl	225 µl	225 µl	225 µl
TBA-Reagenz	125 µl	125 µl	125 µl	125 µl

Tabelle 31: Geräteeinstellungen des Tecan infinite M200 für die Messung der TBA-RS

Parameter	Einstellungen
Platte	Greiner 96 Flat Bottom Black Polystyrol
Programm	Tecan i-control
Modus	Fluoreszenz Messen von unten
Exzitationswellenlänge	532 nm
Emissionswellenlänge	560 nm
Exzitationsbandbreite	9 nm
Emissionsbandbreite	20 nm
Verstärkung	100 manuell
Anzahl der Blitze	15 Stk.
Integrationszeit	20 µs
Verzögerungszeit	2 µs
Ruhezeit	0 ms

4.5.11 Genexpressionanalyse

Die Genexpression mittels der *quantitative real-time polymerase chain reaction* (qPCR) ist eine Methode, um einen gewünschten Anteil der DNA mittels spezifischer Primer zu amplifizieren (Mullis et al. 1986). Die Methode beruht auf Temperaturwechseln, wodurch zunächst die Stränge der Doppelhelix getrennt werden, anschließend spezifische Primer angelagert und die entsprechenden DNA-Sequenzen vervielfältigt werden (Kubista et al. 2006). Der fluoreszierende Farbstoff *Sybr Green* bindet an die DNA und die Fluoreszenz kann somit proportional

Material und Methoden

zur Menge des amplifizierten Produktes bereits während der Analyse quantitativ gemessen werden.

Da die DNA nur durch die PCR amplifiziert und somit quantitativ gemessen werden kann, muss die mRNA, die aus den Gewebeproben isoliert wird, mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Die cDNA kann dann wiederum als Material für die qPCR verwendet werden.

Die Genexpressionsanalyse wurde im Leber- und Nierengewebe sowie in der Jejunummucosa durchgeführt.

Alle Reagenzien, Puffer und Geräte, die für die Messung der Genexpression benötigt wurden, sind in Tabelle 32 aufgeführt.

Tabelle 32: Reagenzien, Puffer und Geräte für die Genexpression

5-fach Green GoTaq® Flexi Buffer	Promega (Madison, USA)
5-fach Puffer	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
1,5% Agarose	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Chloroform	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
DEPC (verwendet als DEPC-H ₂ O)	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) 0,1% DEPC in Aqua bidest für 24 h im Wasserbad bei 37°C inkubiert, autoklaviert
Ethanol (75%)	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
GeneFlash	
GeneRuler™ (100bp)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain	Biotium (Hayward, USA)
HARAEUS Fresco 21	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Isopropanol	Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
KAPA SYBR® Universal	Kapa Biosystems (London, UK)
dNTPs (DNA Polymerisation Mix 10 nM each dNTP)	GeneCraft (Köln, Deutschland)
Oligo-dT-Primer	Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland)
PCR-Tubes (0,1 ml)	LFT-Labortechnik (Wasserburg, Deutschland)
Plattenreader TECAN Infinite® M200	TECAN Austria GmbH (Grödig, Österreich)
Primer*	Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland)
RevertAid™ Reverse Transcriptase 200 U/μl	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Rotor-Gene Q	Qiagen (Hilden, Deutschland)
50x TAE-Puffer	242 g Tris, 57,1 ml konz. Essigsäure, 100 ml EDTA (0,5 M) mit Aqua bidest auf 1 l aufgefüllt
1x TAE-Puffer	40 ml 50x TAE-Puffer mit 1960 ml Aqua bidest aufgefüllt
Thermocycler Professional BASIC	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)
Thermoschüttler	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
TissueLyser	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
TRIzol® Reagent	Invitro_en GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Vortex Genius 3	IKA®-Werke GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland)

* die spezifische Auflistung der Primer ist in Tabelle 35 zu finden

4.5.11.1 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurden je 20 mg der verschiedenen Proben in ein 2 ml- Tube eingewogen, mit 1 ml *TRIzol® Reagent* versetzt und im TissueLyser bei 15 Hz für 4 Min homogenisiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben 15 x geschwenkt, dann 2- 3 Min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (16200 x g, 15 Min, 4°C). Die RNA- haltige obere Phase wurde in ein 1,5 ml- Tube pipettiert und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Dieses Gemisch wurde 10 x geschwenkt, 10 Min bei Raumtemperatur inkubiert und dann zentrifugiert (16200 x g, 10 Min, 4°C). Der entstandene Überstand wurde vollständig entfernt, so dass nur ein Pellet zurückblieb. Nach Zugabe von 1 ml 75%igem Ethanol wurde das Pellet mit dem Vortex Genius 3 gelöst, erneut zentrifugiert (16200 x g, 5 Min, 4°C) und der Überstand wieder restlos abgenommen. Nach 15 Min Trocknungszeit wurden die RNA mit 50 µl DEPC-H₂O im Thermoschüttler bei 60°C und 80 x g für 10 Min in Lösung gebracht. Die RNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

4.5.11.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Für die Messung der RNA Konzentration mit dem *TECAN* wurde die Leber-RNA mit weiteren 190 µl DEPC- H₂O auf insgesamt 240 µl und die Nieren- sowie Jejunum-RNA mit weiteren 100 µl DEPC- H₂O auf insgesamt 150 µl nachverdünnt, um eine geeignete RNA-Konzentration für die cDNA-Synthese zu erhalten. Die Konzentration wurde mit dem Programm *Tecan i- control* bestimmt, indem je 2 µl Probe auf eine *NanoQuant Plate™* aufgetragen und die Absorption bei 260 nm und 280 nm erfasst wurde. Zuvor wurde ein Blanking mit DEPC- H₂O durchgeführt. Die Reinheit der Probe wurde durch den Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt und lag zwischen 1,87 und 1,96.

4.5.11.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit einer einheitlichen RNA-Konzentration von 1,2 µg durchgeführt. Dafür wurde das RNA-Extrakt mit bekannter RNA-Konzentration entsprechend mit DEPC- H₂O auf insgesamt 10 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 15 µl Mastermix wurde die cDNA im Thermocycler mit folgendem Temperatur-Zeit- Programm synthetisiert.

Material und Methoden

Reverse Transkription: 60 Min 42°C

Abbruchreaktion: 10 Min 70°C

Abkühlung: 10 Min 4°C

Die Zusammensetzung des Mastermix ist Tabelle 33 zu entnehmen.

Tabelle 33: Zusammensetzung des Mastermix für die cDNA-Synthese

	Volumen (µl)*
DEPC-H ₂ O	7,45
5-fach Puffer	5
dNTP	1,25
Oligo-dT-Primer	1
Reverse Transkriptase	0,3

* die angegebenen Volumina beziehen sich auf den Ansatz für eine Probe

Die cDNA wurde danach im Verhältnis 1:4 mit DEPC- H₂O auf insgesamt 100 µl verdünnt und bei -20°C gelagert.

4.5.11.4 Real-time quantitative PCR (qPCR)

Da für die große Anzahl der Proben jeweils zwei PCR- Läufe pro Gen nötig waren, wurde vorher ein Pool aus jeweils 1 µl jeder Probe erstellt. Je zwei dieser Poolproben liefen pro Durchgang mit, so dass anschließend beide Läufe aufeinander angepasst werden konnten. Für die qPCR wurde ein Mastermix angefertigt, der die entsprechenden Primer für jedes Gen enthielt. Die Zusammensetzung des Mastermix ist Tabelle 34 zu entnehmen.

Tabelle 34: Zusammensetzung des Mastermix für die qPCR

	Volumen (µl)*
DEPC-H ₂ O	2,6
KAPA SYBR® FAST	5
Primer vorwärts	0,2
Primer rückwärts	0,2

* die angegebenen Volumina beziehen sich auf den Ansatz für eine Probe

Es wurden 8 µl Mastermix in die PCR-Tubes vorgelegt und dann 2 µl cDNA hinzu pipettiert. Neben den beiden Poolproben wurden auch in jedem Lauf zur Kontrolle zwei Ansätze ohne cDNA (No Template Controle, NTC) mitgemessen. Im *Rotor- Gene Q* fand in der ersten Phase eine Denaturierung bei 95°C für 3 Min statt. Darauf folgten 35-40 Zyklen mit erneuter Denaturierung der cDNA-Doppelstränge bei 95°C für 5 Sek, eine Anlagerungsphase (Annealing) bei Primer-spezifischer Temperatur (siehe Tabelle 35) für 20 Sek und eine Synthesephase bei 72°C für 1 Sek. Am Ende wurde jeweils eine Schmelzkurve erstellt, wobei die Temperatur von 50°C auf 95°C anstieg. Der *Rotor- Gene Q* ermittelte den, von uns festgelegten, C_t-Wert (cycle threshold) jeder Probe bei 0,06, wodurch die mRNA- Expression im Vergleich zu den anderen Proben bestimmt werden konnte. Der Threshold wurde so gewählt, dass er in einem Bereich lag, in dem der Anstieg der Fluoreszenz exponentiell war. Der C_t-Wert ist umgekehrt proportional zur relativen Expression des Gens. Als erstes wurden fünf Referenzgene gemessen, aus denen mit Hilfe von *GeNorm* die drei stabilsten Gene ermittelt wurden, die das Programm wiederum für die Berechnung der Normalisierungsfaktoren (Vandesompele et al. 2002) heranzog.

Außerdem wurde für jedes verwendete Gen mittels einer Verdünnungsreihe die Primereffizienz mit folgender Formel ermittelt.

$$E=10^{(-1/\text{Steigung})}$$

Die Verdünnungsreihe wurde mit den Verdünnungen 1:3, 1:9, 1:27, 1:81 und 1:243 erstellt. Anhand der erhaltenen C_t-Werte konnte dann eine logarithmische Standardkurve erstellt werden, aus welcher die Steigung abgelesen wurde. Die Primereffizienz sollte möglichst nah am optimalen Wert E=2 liegen. Dieser ergibt sich,

wenn die Anzahl der PCR-Produkte in jedem Zyklus verdoppelt wird (Wiedemann et al. 2004).

Die Primer wurden mit Hilfe der Software *Beacon DesignerTM* (Premier Biosoft International, USA) und *BLAST* (National Center for Biotechnology Information, NCBI) nach der Methode von Thornton & Basu (2011) entworfen.

Tabelle 35: Verwendete Primer und ihre Eigenschaften

Gen	Primersequenz (5' → 3')		Produkt- größe (bp)	T _A (°C)	Primer- effizienz	NCBI-GenBank
	vorwärts	rückwärts				
Referenzgene						
ACTB	ATGAAGCCCAGAGCAAAAGA		223	60	1,84	NM_205518.1
	GGGGTGTGAAGGTCTCAA					
GAPDH	ACTGTCAAGGCTGAGAACGG		204	60	1,91	NM_204305.1
	AGCTGAGGGAGCTGAGATGA					
RPL13	ATGGGAGCAACAAGAAGACG		139	58	1,82	NM_001252255.1
	TTGGAAGACACGTTGTGAGC					
SDHA	ATTCCCGTTTTGCCTACGGT		172	60	1,80	NM_001277398.1
	GGGAGTTTGCTCCAAGACGA					
YWHAZ	TTCCAACCTCCGTCTGCCTC		328	60	1,95	NM_001031343
	AGCAGTCTTCCTCGCTTGAC					
Zielgene						
SOD1	GGAGGAGTGGCAGAAGTAGA		161	60	1,81	NM_205064.1
	GCTAAACGAGGTCCAGCATT					
CAT	ACCAAGTACTGCAAGGCGAA		245	60	1,94	NM_001031215.1
	TGAGGGTTCCTCTTCTGGCT					
GPx7	TTGTAAACATCAGGGGCAAA		141	58	1,76	NM_001163245.1
	ATGGGCCAAGATCTTTCTGTAA					
GPx2	GAGAACGGCACCAACGAG		136	60	1,88	NM_001277854.1
	TCAGGTAGGCGAAGACGG					

Abkürzungen: *ACTB*: β-Actin; *CAT*: Catalase; *GAPDH*: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; *GPx2*: Glutathionperoxidase 2 (gastrointestinal); *GPx7*: Glutathionperoxidase 7; *RPL13*: Ribosomal protein L13; *SDHA*: Succinat-Dehydrogenase Untereinheit A; *SOD1*: Superoxiddismutase; T_A: Annealing-Temperatur; *YWHAZ*: Tyrosin-3-Monooxygenase/Tryptophan-5-Monooxygenase aktivierendes Protein, ζ-Polypeptid

4.5.11.5 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein Agarosegel aus 2,25 g 1,5% Agarose, 150 ml 1xTAE-Puffer und 3 µl *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* hergestellt. Als Gellaufpuffer wurde 1xTAE-Puffer verwendet. Es wurden jeweils 5 µl PCR-Produkt mit 5 µl DEPC- H₂O und 2 µl *Green GoTaq® Flexi Buffer* gemischt und je 10 µl in eine Geltasche pipettiert. Als Vergleichswert wurden 4 µl der DNA- Leiter *GeneRuler™* (100 bp) mittig aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 V und bis zu 150 mA so lange bis die Laufmittelfront ca. 3/4 des Gels durchlaufen hatte. Anschließend wurden die Banden mit dem *GeneFlash* durch UV-Fluoreszenz sichtbar gemacht und mit den Größen der DNA-Leiter verglichen.

4.6 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit der Statistiksoftware *Minitab*® (Version 13, Minitab Ltd., Michigan, USA) durchgeführt. Die Daten wurden zunächst anhand ihrer Residuen und dem „Anderson- Darling“- Test auf Normalverteilung getestet und ihre Varianzhomogenität überprüft. Anschließend wurden die Daten mit einer Varianzanalyse ausgewertet, wobei eine 3- Way- ANOVA verwendet wurde. Die fixen Faktoren der Analyse waren die Methioninquelle, die Methioninkonzentration und der Versuchsdurchgang. Außerdem wurde die Interaktion zwischen den genannten Faktoren berücksichtigt. Die experimentelle Einheit stellte in der Regel das Einzeltier bzw. bei der Futteraufnahme und der Futtermittelverwertung der Käfig dar.

Bei der PCR-Auswertung wurden die C_t -Werte der gemessenen Gene quantifiziert ($\text{Primereffizienz}^{\Delta} C_t$) und anhand der Normalisierungsfaktoren normalisiert. Mit Hilfe ihrer Residualwerte und dem „Anderson- Darling“-Test wurde anschließend die Normalverteilung getestet und anhand von Z-Werten ($\text{Residualwert} / \text{Standardabweichung aller Residuen}$), mit einer Ober- bzw. Untergrenze von 1,8 bzw. – 1,8, die Ausreißer detektiert.

Um die Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen-Mittelwerten zu ermitteln, wurde der „Tukey“-Post-hoc-Test angewendet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ wurden die Mittelwerte als signifikant unterschiedlich angesehen. Im folgenden Ergebnisteil werden die Daten als Mittelwert (MW) mit der entsprechenden Standardabweichung (SD) dargestellt.

5 Ergebnisse

Ein Teil der Daten im folgenden Ergebnisteil wurden bereits in einer Originalarbeit veröffentlicht (Zeit et al. 2018).

5.1 Leistungsdaten

Im Verlauf des Fütterungsversuchs wurden die Leistungsdaten durch verschiedene Parameter aufgezeichnet und dargestellt. Hierzu zählten sowohl die Anfangs- und Endgewichte, als auch die gesamte Gewichtszunahme und durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme in den einzelnen Mastphasen (Tag 1-10, Tag 11-21 und Tag 22-35). Außerdem wurde die tägliche und gesamte Futteraufnahme in jeder Mastphase aufgezeichnet. Da es hierbei nur möglich war, die Futteraufnahme pro Käfig zu ermitteln, wurde die durchschnittliche Futteraufnahme je Tier daraus berechnet. Aus dem Quotienten der Futteraufnahme und der Gewichtszunahme wurde zudem die Futtermittelverwertung bestimmt.

5.1.1 Lebendmassen und Zunahmen

Die Tiere aller Gruppen hatten zu Beginn des Versuchs ein durchschnittlich identisches Startgewicht ($40,1 \text{ g} \pm 4,03 \text{ g}$) (Tabelle 36). Bezüglich der Endkörpergewichte sowie der Gewichtszunahmen wies die Kontrollgruppe nach allen drei Fütterungsphasen (Starter, Grower und Finisher) und auch nach der gesamten Fütterungsperiode signifikant niedrigere Werte auf als alle Gruppen mit Methioninzulage (Tabelle 36). In der Finisher-Phase zeigte die Gruppe DLM 0,1 zusätzlich signifikant niedrigere Werte im Vergleich zur Gruppe MHA 0,4 (Tabelle 36). Außerdem gab es, bei ausschließlicher Betrachtung der Methioninkonzentration im Post-hoc-Test der statistischen Auswertung, bei den Gewichtszunahmen in der Grower- und Finisher-Phase sowie der gesamten Fütterungsperiode signifikante Unterschiede zwischen den Methioninzulagestufen 0,1% und 0,4%. Diese sind im Anhang graphisch dargestellt (Abbildung 23, Abbildung 24 und Abbildung 25). Nach der Finisher-Phase waren die Endkörpergewichte der Broiler mit einer

Ergebnisse

Methioninzulage von 0,1% zudem signifikant niedriger als bei den Broilern, deren Futter mit 0,25% und 0,4% Methionin supplementiert wurde (Abbildung 26 im Anhang). Zwischen den Quellen DLM und MHA waren in allen Leistungskriterien keine Unterschiede zu erkennen.

Außerdem gab es signifikante Unterschiede zwischen den drei Versuchsdurchgängen, daher wurden diese im statistischen Model (3-Way-ANOVA) berücksichtigt. Interaktionen zwischen den Behandlungen der drei Versuchsdurchgänge gab es dabei nicht. Die Effekte des Durchgangs auf die Endgewichte lassen sich durch unterschiedliche Anfangsgewichte erklären. Die entsprechenden Daten sind im Anhang (Tabelle 49) aufgeführt.

5.1.2 Futteraufnahme und Futterverwertung

Sowohl nach der Grower- und Finisher-Phase als auch nach der gesamten Fütterungsperiode war die Futteraufnahme in der Kontrollgruppe signifikant niedriger als in allen Gruppen mit Methioninzulage. Ebenso war in den genannten Fütterungsabschnitten die Futterverwertung in der Kontrollgruppe signifikant schlechter als in den anderen Gruppen (Tabelle 36). Innerhalb der sechs Behandlungsgruppen waren keine Unterschiede festzustellen. Nach der Starter-Phase zeigte sich eine signifikant schlechtere gesamte Futteraufnahme sowie Futterverwertung in der Kontrollgruppe im Vergleich zu den drei Zulagestufen, wenn man im Post-hoc-Test der statistischen Auswertung nur die Methioninkonzentration berücksichtigt (Tabelle 36). Dies ist im Anhang (Abbildung 27 und Abbildung 28) graphisch dargestellt. Außerdem die Futterverwertung bei einer Methioninzulage von 0,4% in der gesamten Fütterungsperiode signifikant besser im Vergleich zu einer Fütterung mit 0,1% Methionin (Abbildung 29 im Anhang).

Alle, in Tabelle 36 dargestellten, signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bezogen sich auf die Methioninkonzentration. Durch die Methioninquelle hervorgerufene signifikante Unterschiede oder Interaktionen gab es nicht.

Ergebnisse

Tabelle 36: Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die Leistungsdaten in der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21), Finisher-Phase (Tag 22-35) und nach der gesamten Fütterungsperiode¹

Methioninzulage ²	0			0,1			0,25			0,4			P-Werte ³		
	Methioninquelle	Kontrolle	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	K	Q	Q*K
Starter (Tag 10)															
Anfangskörpergewicht (g)		39,7±4,3	39,8±3,9	40,1±4,3	40,3±3,9	40,4±4,1	40,3±3,9	40,4±4,1	40,3±3,8	40,4±3,9	0,81	0,89	0,96		
Endkörpergewicht (g)		240±29 ^b	274±23 ^a	281±31 ^a	279±27 ^a	277±30 ^a	274±26 ^a	280±25 ^a	<0,001	0,52	0,21				
Gewichtszunahme (g)		201±26 ^b	234±21 ^a	241±28 ^a	239±24 ^a	237±27 ^a	234±24 ^a	239±23 ^a	<0,001	0,53	0,18				
Gesamte FA (g) ⁴		240±15	256±24	264±31	260±19	273±25	265±22	261±36	0,001	0,53	0,72				
Futterverwertung ⁴		1,19±0,07	1,10±0,08	1,10±0,02	1,09±0,06	1,14±0,06	1,13±0,02	1,09±0,11	0,01	0,93	0,51				
Grower (Tag 21)															
Endkörpergewicht (g)		855±96 ^b	1096±71 ^a	1103±104 ^a	1134±94 ^a	1132±80 ^a	1133±67 ^a	1141±94 ^a	<0,001	0,92	0,93				
Gewichtszunahme (g) ⁵		615±79 ^b	821±54 ^a	821±85 ^a	855±75 ^a	851±67 ^a	860±51 ^a	861±74 ^a	<0,001	0,87	0,99				
Gesamte FA (g)		868±37 ^b	1035±35 ^a	1045±57 ^a	1062±73 ^a	1061±39 ^a	1085±40 ^a	1047±77 ^a	<0,001	0,49	0,52				
Futterverwertung		1,42±0,05 ^a	1,26±0,02 ^b	1,27±0,02 ^b	1,24±0,04 ^b	1,25±0,02 ^b	1,26±0,04 ^b	1,22±0,04 ^b	<0,001	0,51	0,20				

Ergebnisse

Finisher (Tag 35)

Endkörpergewicht (g) ⁶	1851±292 ^c	2536±197 ^b	2580±269 ^{ab}	2673±259 ^{ab}	2712±177 ^{ab}	2694±225 ^{ab}	2766±226 ^a	<0,001	0,22	0,89
Gewichtszunahme (g) ⁵	995±218 ^c	1444±162 ^b	1476±161 ^{ab}	1532±215 ^{ab}	1576±138 ^{ab}	1562±187 ^{ab}	1620±177 ^a	<0,001	0,17	0,86
Gesamte FA (g)	2014±194 ^b	2397±191 ^a	2508±179 ^a	2350±222 ^a	2465±157 ^a	2411±164 ^a	2467±158 ^a	<0,001	0,27	0,90
Futterverwertung	2,03±0,19 ^a	1,66±0,14 ^b	1,69±0,08 ^b	1,55±0,09 ^b	1,57±0,05 ^b	1,55±0,1 ^b	1,53±0,05 ^b	<0,001	0,90	0,98

Gesamte Fütterungsperiode

Gewichtszunahme (g) ⁵	1812±291 ^c	2496±195 ^b	2539±267 ^{ab}	2632±259 ^{ab}	2670±178 ^{ab}	2653±225 ^{ab}	2725±225 ^a	<0,001	0,23	0,90
Gesamte FA (g)	3122±236 ^b	3689±201 ^a	3818±242 ^a	3672±292 ^a	3799±211 ^a	3761±200 ^a	3776±265 ^a	<0,001	0,39	0,87
Futterverwertung ⁵	1,72±0,09 ^a	1,48±0,07 ^b	1,49±0,05 ^b	1,40±0,06 ^b	1,43±0,03 ^b	1,42±0,05 ^b	1,39±0,05 ^b	<0,001	1,00	0,82

¹ Es wird der Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt (n=6/Gruppe), ² Methioninzulage in % der Ration, ³ P-Werte: K= Methioninkonzentration, Q= Methioninquelle; der Versuchsdurchgang wurde statistisch mit einbezogen, ist hier aber nicht dargestellt; FA= Futteraufnahme, ⁴ Die Kontrollgruppe war signifikant unterschiedlich zu allen Methioningruppen, wenn im Post-hoc-Test nur die Methioninkonzentration betrachtet wurde; ⁵ Die Gruppen mit 0,1% Methionin waren signifikant unterschiedlich zu den Gruppen mit 0,25% Methionin, wenn im Post-hoc-Test nur die Methioninkonzentration betrachtet wurde ⁶ Die Gruppen mit 0,1% Methionin waren signifikant unterschiedlich zu den Gruppen mit 0,25% und 0,4% Methionin, wenn im Post-hoc-Test nur die Methioninkonzentration betrachtet wurde

5.2 Schlachtkörperdaten

In der Auswertung der Schlachtkörperdaten wurde das *Schlachtgewicht* (Definition siehe Kapitel 4.4) und die *Ausschlachtung* (%) (prozentuales Verhältnis vom Schlachtgewicht zum Lebendgewicht) berücksichtigt. Außerdem wurden im Folgenden die Daten der Brustmuskeltgewichte in % zum Schlachtgewicht sowie die Nieren- und Lebergewichte in % der Lebendmasse (LM) dargestellt. Nach der Finisher-Phase wurde zusätzlich auch das Jejunumgewicht und das Gewicht des abdominalen Fettgewebes in % der LM ausgewertet.

Nach der Starter-Phase (Tag 10) waren höhere Werte der Schlachtgewichte, Ausschlachtung und Brustmuskeltgewichte in den Gruppen mit Methioninzulage im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennbar. Signifikante Unterschiede gab es jedoch nur vereinzelt zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen DLM 0,25 und DLM 0,4. Die Nierengewichte zeigten in allen Gruppen mit Methioninzulage signifikant niedrigere Werte als in der Kontrollgruppe. Beim Lebergewicht gab es nach dem 10. Fütterungstag hingegen keine Unterschiede innerhalb der sieben Gruppen (Tabelle 37).

Nach der Grower-Phase (Tag 21) waren das Schlachtgewicht und die Ausschlachtung in allen Methionin-supplementierten Gruppen signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die Gruppen mit Methioninzulage unterschieden sich hingegen nicht voneinander (Tabelle 37). Das Brustmuskeltgewicht der Kontrollgruppe wies ebenfalls signifikant niedrigere Werte im Vergleich zu fast allen anderen Gruppen auf. Eine Ausnahme stellte dabei die Gruppe MHA 0,1 dar, deren Brustmuskeltgewicht nach dem 21. Fütterungstag signifikant niedriger war als in allen anderen Gruppen mit Methioninzulage (Tabelle 37). Die Leber- und Nierengewichte (in % der LM) wiesen nach der Grower-Phase in allen Methionin-supplementierten Gruppen niedrigere Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe auf, signifikante Unterschiede gab es jedoch nur zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen mit 0,25% und 0,4% Methioninzulage (Tabelle 37).

Sowohl nach der Starter- als auch nach der Finisher- Phase bezogen sich alle Signifikanzen auf die Methioninkonzentration, während zwischen den Methioninquellen keine signifikanten Unterschiede zu beobachten waren.

Ergebnisse

Nach der Finisher-Phase (Tag 35) zeigte sich, dass die Kontrollgruppe signifikant niedrigere Schlachtgewichte und Werte der Ausschlachtung aufwies als alle Gruppen mit Methioninzulage. Zwischen den einzelnen Gruppen mit Methioninzulage gab es weder in Bezug auf die Quelle noch auf die Konzentration signifikante Unterschiede (Tabelle 36). Auf die Brustmuskeltgewichte nach der Finisher-Phase hatten sowohl die Methioninkonzentration als auch die -quelle signifikante Effekte. Die Brustmuskeltgewichte in der Kontrollgruppe wiesen signifikant niedriger Werte im Vergleich zu allen anderen Behandlungsgruppen auf (Tabelle 36). Zudem führte die Supplementation mit DLM bei einer Zulagehöhe von 0,1% zu signifikant höheren Brustmuskeltgewichten als die equimolare Zulage von MHA. Außerdem lag beim Brustmuskeltgewicht nach dem 35. Fütterungstag ein signifikanter Interaktionseffekt zwischen Methioninkonzentration und Methioninquelle vor. Während MHA bei einer Zulage von 0,1% Methionin signifikant niedrigere Werte aufwies als DLM, waren die Werte der beiden Quellen bei der Zulage von 0,25% und 0,4% annähernd gleich (Tabelle 36).

In ähnlicher Weise stellt es sich bei den relativen Gewichten von Leber, Niere und Jejunum bezogen auf die Lebendmasse dar. Alle drei Organe waren in der Kontrollgruppe signifikant schwerer als in den Methionin-supplementierten Gruppen. Zudem war das relative Nierengewicht der Gruppen DLM 0,25, DLM 0,4 und MHA 0,4 signifikant niedriger im Vergleich zur Gruppe MHA 0,1. Außerdem zeigte der signifikante Effekt der Methioninquellen auf das Nierengewicht nach Tag 35, dass die Zulage von DLM zu niedrigeren relativen Nierengewichten führte als MHA (Tabelle 36). Das abdominale Fettgewebe wies in der Kontrollgruppe nach Tag 35 zwar höhere Gewichte im Vergleich zu allen anderen Gruppen auf, Signifikanzen gab es aber nur zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Gruppen MHA 0,1 und DLM 0,25 (Tabelle 36).

Auch nach der Finisher-Phase wurden alle signifikanten Unterschiede, mit Ausnahme vom Brustmuskelt- und Nierengewicht, ausschließlich durch die Variable der Methioninkonzentration hervorgerufen.

Ergebnisse

Tabelle 37: Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die Schlachtkörperdaten nach der Starter- (Tag 1-10), Grower-Phase (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35) ¹

Methioninzulage ²	0			0,1			0,25			0,4			P-Werte ³		
	Kontrolle	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	K	Q	Q*K	
Starter (Tag 10)															
Schlachtgewicht (g)	139±9 ^b	162±12 ^{ab}	174±22 ^{ab}	178±16 ^a	172±24 ^{ab}	176±16 ^{ab}	177±19 ^{ab}	<0,001		0,78				0,18	
Ausschlachtung (%)	59,3±1,3 ^b	60,7±1,8 ^{ab}	62,6±2,6 ^{ab}	63,9±3,0 ^{ab}	63,3±4,8 ^{ab}	64,1±2,8 ^a	63,8±2,9 ^{ab}	<0,001		0,47				0,13	
Brustmuskel (% SG)	15,9±0,9 ^b	17,2±0,6 ^{ab}	17,1±0,7 ^{ab}	18,6±1,0 ^a	17,8±0,5 ^{ab}	18,3±0,9 ^a	18,2±1,3 ^{ab}	<0,001		0,19				0,60	
Leber (% LM)	4,23±0,37	3,90±0,37	3,90±0,24	4,03±0,29	4,04±0,32	3,98±0,27	4,00±0,32	0,13		0,76				0,98	
Nieren (% LM)	1,33±0,18 ^a	0,99±0,13 ^b	0,94±0,15 ^b	0,94±0,08 ^b	0,81±0,08 ^b	0,86±0,08 ^b	0,90±0,12 ^b	<0,001		0,62				0,57	
Grower (Tag 21)															
Schlachtgewicht (g)	560±43 ^b	774±59 ^a	788±53 ^a	793±76 ^a	784±56 ^a	818±46 ^a	791±97 ^a	<0,001		0,73				0,84	
Ausschlachtung (%)	66,1±1,6 ^b	70,6±2,0 ^a	70,2±0,7 ^a	70,6±1,8 ^a	70,4±1,1 ^a	71,7±1,3 ^a	70,6±2,5 ^a	<0,001		0,36				0,87	
Brustmuskel (% SG)	20,7±1,2 ^c	23,2±1,1 ^{ab}	22,2±0,8 ^{bc}	24,5±1,2 ^a	24,2±1,1 ^{ab}	25,1±1,3 ^a	24,6±1,0 ^a	<0,001		0,14				0,66	
Leber (% LM)	3,11±0,46 ^a	2,63±0,23 ^{ab}	2,61±0,08 ^{ab}	2,47±0,26 ^b	2,39±0,27 ^b	2,43±0,22 ^b	2,54±0,31 ^{ab}	<0,001		0,89				0,85	
Nieren (% LM)	0,84±0,12 ^a	0,68±0,03 ^{ab}	0,69±0,06 ^{ab}	0,62±0,04 ^b	0,63±0,08 ^b	0,64±0,06 ^b	0,63±0,02 ^b	<0,001		1,00				0,98	

Ergebnisse

Finisher (Tag 35)

Schlachtgewicht (g)	1223±159 ^b	1944±83 ^a	1945±85 ^a	1970±153 ^a	1993±125 ^a	1964±97 ^a	2106±123 ^a	<0,001	0,11	0,21
Ausschlachtung (%)	68,2±1,8 ^b	73,7±0,7 ^a	72,6±1,5 ^a	73,8±1,6 ^a	73,8±0,9 ^a	73,3±1,7 ^a	74,6±1,5 ^a	<0,001	0,86	0,14
Brustmuskel (% SG)	21,0±1,9 ^c	28,2±1,8 ^a	25,4±1,7 ^b	27,3±2,0 ^{ab}	26,4±1,8 ^b	27,9±1,3 ^a	28,6±1,2 ^a	<0,001	0,03	0,01
Leber (% LM)	2,11±0,2 ^a	1,75±0,2 ^b	1,83±0,13 ^b	1,72±0,09 ^b	1,68±0,16 ^b	1,72±0,17 ^b	1,70±0,16 ^b	<0,001	0,63	0,69
Nieren (% LM)	0,70±0,08 ^a	0,53±0,03 ^{bc}	0,57±0,04 ^b	0,50±0,04 ^c	0,54±0,04 ^{bc}	0,49±0,03 ^c	0,50±0,03 ^c	<0,001	0,02	0,25
Jejunum (% LM)	2,38±0,38 ^a	1,79±0,21 ^b	1,85±0,16 ^b	1,86±0,13 ^b	1,75±0,26 ^b	1,68±0,11 ^b	1,59±0,08 ^b	<0,001	0,52	0,69
Abdominales FG (% LM)	1,87±0,27 ^a	1,66±0,29 ^{ab}	1,55±0,3 ^b	1,55±0,33 ^b	1,63±0,3 ^{ab}	1,71±0,27 ^{ab}	1,63±0,28 ^{ab}	<0,001	0,63	0,49

¹ Es wird der Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt (n=6/Gruppe), ² Methioninzulage in % der Ration, ³ P-Werte: K= Methioninkonzentration
Q= Methioninquelle; der Versuchsdurchgang wurde statistisch mit einbezogen, ist hier aber nicht dargestellt; FG= Fettgewebe, LM= Lebendmasse,
SG= Schlachtgewicht

5.3 Parameter des antioxidativen Status in Plasma und Geweben

Um den antioxidativen Status von Plasma und Geweben zu ermitteln, wurden verschiedene Parameter untersucht. Dazu gehörten die Konzentrationen von Tocopherol, Glutathion, TBA-RS und PC, durch welche man wichtige Rückschlüsse auf die antioxidative Kapazität ziehen konnte. Die Tocopherole und TBA-RS wurden in der Darstellung auf die TG bzw. die PC auf das Gesamtprotein bezogen. Aufgrund der lipophilen Eigenschaften des Tocopherols kann dieses nur in Verbindung mit Lipoproteinen transportiert werden (Traber & Sies 1996). Die, in den Lipoproteinen enthaltenen, Triglyceride waren somit eine geeignete Bezugsgröße, um die Tocopherolkonzentration darzustellen. Der Bezug der TBA-RS und PC auf die TG bzw. das Gesamtprotein diente dazu, den Anteil der geschädigten Fettsäuren bzw. Proteine darzustellen. Außerdem erfolgten die Messungen der Genexpression und der Enzymaktivitäten von CAT, GPx und SOD. Diese antioxidativen Enzyme spielen eine wichtige Rolle im antioxidativen System, indem sie reaktive Sauerstoffspezies unschädlich machen.

5.3.1 Nicht-enzymatische Antioxidantien und Oxidationsprodukte

Im Plasma zeigten sich nach der Starter-Phase keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Tocopherolkonzentration zwischen den sieben Versuchsgruppen. Nach der Grower-Phase war die Tocopherolkonzentration in der Gruppe DLM 0,25 signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe und den Gruppen DLM 0,1 und DLM 0,4. Zusätzlich war ein signifikanter Interaktionseffekt zwischen der Methioninkonzentration und der Methioninquelle zu erkennen. Während die Werte der MHA-Gruppen bei einer Methioninzulage von 0,1% und 0,4% etwas höhere Werte aufwiesen als die jeweiligen DLM- Gruppen mit gleicher Methioninzulage, war die Tocopherolkonzentration in der MHA- Gruppe mit 0,25% Methioninzulage deutlich niedriger im Vergleich zur DLM- Gruppe (Tabelle 38). Die Tocopherolkonzentration nach der Finisher-Phase war in allen Gruppen mit Methioninzulage signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Zusätzlich wies die Gruppe DLM 0,4 eine signifikant höhere Konzentration im Vergleich zu den Gruppen DLM 0,1, MHA 0,1 und MHA 0,4 auf. Außerdem zeigte sich nach der Finisher-Phase ein signifikanter Unterschied zwischen

Ergebnisse

den beiden Methioninquellen, wobei die Tocopherolkonzentration der DLM-Gruppen höher war als die der MHA-Gruppen (Tabelle 38).

Die GSH-Konzentration im Plasma zeigte nach der Grower- und der Finisher-Phase keine signifikanten Unterschiede zwischen den sieben Versuchsgruppen. Nach der Starter-Phase war ein signifikanter Unterschied zwischen den Methioninquellen zu sehen. Die Quelle DLM ergab dabei höhere GSH-Konzentrationen als die Quelle MHA (Tabelle 38).

Im Plasma war die Konzentration an TBA-RS nach der Starter-Phase in der Kontrollgruppe signifikant höher als in allen Gruppen mit Methioninzulage. (Tabelle 38). Nach der Grower- und Finisher-Phase waren keine Effekte zwischen den Versuchsgruppen bezüglich der TBA-RS im Plasma zu erkennen (Tabelle 38).

Während nach der Starter- und Grower-Phase im Plasma keine signifikanten Unterschiede bezüglich der PC zu erkennen waren, zeigte sich nach der Finisher-Phase eine signifikant höhere PC-Konzentration in der Kontrollgruppe im Vergleich zu allen Gruppen mit Methioninzulage, wenn man im Post- hoc- Test der statistischen Auswertung nur die Methioninkonzentration betrachtete (Tabelle 38). Dies ist auch im Anhang (Abbildung 32) graphisch dargestellt.

Im Lebergewebe hatte die Methioninzulage in den Fütterungsrationen der Broiler laut Varianzanalyse einen signifikanten Einfluss auf die Tocopherolkonzentrationen (Tabelle 39). Welche Methioninquelle eingesetzt wurde, spielte dabei keine Rolle. Im Post- hoc- Test der statistischen Auswertung waren daher nur Signifikanzen zu erkennen, wenn man ausschließlich die Methioninkonzentrationen betrachtete. Dies ist graphisch im Anhang (Abbildung 30) dargestellt. Die Tocopherolkonzentration in der Kontrollgruppe wies nach der Starter-Phase signifikant niedrigere Werte auf im Vergleich zu den Gruppen mit 0,1% und 0,25% Methioninzulage (Abbildung 30 A) sowie zu den Gruppen mit 0,25% und 0,4% Methioninzulage nach der Grower-Phase (Abbildung 30 B). Nach der Finisher-Phase war die Tocopherolkonzentration in der Kontrollgruppe signifikant niedriger als in den Gruppen mit einer Methioninzulage von 0,25% (Abbildung 30 C).

Bezüglich der GSH-Konzentration gab es im Lebergewebe nach allen drei Fütterungsphasen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Nach der Starter-Phase wies die Gruppe DLM 0,4 eine signifikant höhere GSH-

Ergebnisse

Konzentration im Vergleich zur Gruppe MHA 0,1 auf (Tabelle 39). Nach der Grower-Phase zeigte die Kontrollgruppe signifikant niedrigere Werte im Vergleich zu allen Methionin-supplementierten Gruppen und außerdem enthielt das Lebergewebe der Gruppen mit 0,4% Methionin signifikant höhere Konzentrationen an GSH als die Gruppen mit 0,1% Methioninzulage (Tabelle 39). Nach dem Ende der Fütterungsperiode (Tag 35) wiesen lediglich die Gruppen mit 0,25% und 0,4% Methioninzulage signifikant höhere Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Tabelle 39).

Bei den TBA- RS-Konzentration im Lebergewebe waren kaum Effekte der Behandlung festzustellen. Nach Grower- und Finisher-Phase gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den sieben Versuchsgruppen (Tabelle 39). Nach der Starter- Phase zeigte sich eine Signifikanz bezüglich der Methioninquelle. Die Gruppen, die mit einer DLM- Zulage gefüttert wurden wiesen signifikant höhere TBA- RS-Konzentrationen in der Leber auf als die Gruppen mit einer MHA-Fütterung (Tabelle 39). Die unterschiedlichen Methioninkonzentrationen führten, wie nach den beiden anderen Fütterungsphasen, aber auch nach der Starter-Phase zu keinem weiteren Effekt.

Die PC-Konzentrationen in der Leber wiesen nach der Starter- und Grower-Phase keine Effekte zwischen den Versuchsgruppen auf. Nach der Finisher-Phase zeigte sich im Lebergewebe, dass die Konzentration der PC in der Kontrollgruppe signifikant höher war als in den Gruppen mit 0,4% Methioninzulage. Die PC-Konzentration in den Gruppen mit 0,1% und 0,25% Methionin waren zwar etwas niedriger als in der Kontrollgruppe, aber ein signifikanter Effekt war nicht festzustellen (Tabelle 39).

Im Nierengewebe wurden nur die Tocopherolkonzentrationen bestimmt. Dabei hatten nach allen drei Fütterungsphasen weder die Methioninkonzentration noch die Methioninquelle einen signifikanten Einfluss auf die Tocopherolkonzentrationen (Tabelle 40). Nach der Finisher-Phase zeigte sich jedoch ein signifikanter Interaktionseffekt. Die MHA-Gruppe mit einer Methioninzulage von 0,1% zeigte deutlich höhere Werte als die entsprechende DLM-Gruppe, während die MHA-Gruppen mit 0,25% und 0,4% Methioninzulage niedrigere Tocopherolkonzentrationen

Ergebnisse

aufwiesen im Vergleich zu den DLM-Gruppen mit gleicher Methioninzulage (Tabelle 40).

In der Jejunummucosa hatten nach der Starter-Phase sowohl die Methioninquelle als auch die Methioninkonzentration in der Boilerration einen signifikanten Einfluss auf die Tocopherolkonzentrationen. Die Gruppe MHA 0,4 wies eine signifikant höhere Tocopherolkonzentration auf als die Kontrollgruppe und alle anderen Gruppen mit Methioninzulage. Auch die Tocopherolkonzentrationen in den MHA-Gruppen der Zulagestufen 0,1% und 0,4% waren etwas höher als die entsprechenden DLM-Gruppen. Die Zulage von MHA führte folglich zu signifikant höheren Tocopherolkonzentrationen im Vergleich zu DLM. Außerdem war nach der Starter-Phase ein signifikanter Interaktionseffekt zu sehen ($P=0,003$). Dieser kam dadurch zustande, dass die Werte der Gruppe MHA 0,4 im Vergleich zur Gruppe DLM 0,4 deutlich höher waren, während die Tocopherolkonzentrationen in den Gruppen MHA und DLM der anderen Zulagestufen sich nur etwas oder sogar kaum unterschieden (Tabelle 41).

Nach der Grower-Phase gab es einen signifikanten Interaktionseffekt. Die Tocopherolkonzentration in der Gruppe MHA 0,1 war deutlich höher als die in der Gruppe DLM 0,1, wohingegen die beiden Methioninquellen bei einer Zulage von 0,25% Methionin gleiche Werte aufwiesen und bei einer Methioninzulage von 0,4% sogar DLM eine etwas höhere Tocopherolkonzentration aufwies im Vergleich zu MHA (Tabelle 41).

Der deutlichste Effekt zeigte sich bei den älteren Tieren nach dem 35. Tag der Mast. Hier wiesen alle Gruppen mit Methioninzulage höhere Tocopherolkonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Einen signifikanten Unterschied gab es dabei jedoch nur zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe DLM 0,25 (Tabelle 41). Betrachtete man beim Post-hoc-Test der statistischen Auswertung ausschließlich die Methioninkonzentration, zeigte die Kontrollgruppe sogar signifikant niedrigere Werte im Vergleich zu allen Gruppen mit Methioninzulage. Dies ist im Anhang (Abbildung 31) graphisch dargestellt.

Ergebnisse

Bezüglich der GSH-Konzentration konnten in der Jejunummucosa nach allen drei Fütterungsphasen keine Effekte zwischen den sieben Versuchsgruppen festgestellt werden (Tabelle 41).

Tabelle 38: Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die Konzentration von Tocopherol, Glutathion, TBA-RS und Proteincarbonylen im Plasma nach der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35)¹

Methioninzulage ²	0			0,1			0,25			0,4			P-Werte ³		
Methioninquelle	Kontrolle	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	K	Q	Q*K			
Starter (Tag 10)															
Tocopherol (µmol/g TG)	31,7±9,3	35,7±14,35	31,0±7,82	35,9±6,71	39,0±7,98	33,7±6,33	36,6±8,91			0,95	0,81	0,42			
Glutathion (µmol/l) ⁴	3,32±1,14	3,87±2,32	3,81±1,56	3,81±1,53	3,48±1,14	4,00±1,79	3,69±1,23			0,80	0,046	0,53			
TBA-RS (µmol/g TG)	4,39±1,4 ^a	2,76±0,66 ^b	2,49±0,47 ^b	2,85±0,6 ^b	2,42±0,58 ^b	2,00±0,4 ^b	2,03±0,14 ^b			<0,001	0,11	0,82			
PC (nmol/mg Protein)	1,50±0,1	1,45±0,14	1,54±0,16	1,40±0,08	1,49±0,21	1,51±0,53	1,49±0,18			0,54	0,31	0,75			
Grower (Tag 21)															
Tocopherol (µmol/g TG)	38,4±4,33 ^b	30,7±7,67 ^b	42,1±7,16 ^{ab}	57,2±15,87 ^a	45,6±8,34 ^{ab}	37,6±6,17 ^b	49,4±11,0 ^{ab}			0,002	0,27	0,01			
Glutathion (µmol/l)	3,32±1,65	3,22±2,18	3,51±1,77	4,25±1,91	4,04±0,99	4,00±1,53	3,98±1,45			0,43	0,66	0,75			
TBA-RS (µmol/g TG)	2,30±0,61	1,99±0,43	2,08±0,51	2,47±0,39	2,14±0,11	2,18±0,24	2,20±0,89			0,62	0,85	0,92			
PC (nmol/mg Protein)	1,44±0,19	1,35±0,31	1,44±0,21	1,34±0,15	1,50±0,1	1,50±0,2	1,38±0,17			0,95	0,73	0,49			
Finisher (Tag 35)															
Tocopherol (µmol/g TG)	19,8±4,3 ^c	41,8±13,9 ^b	44,3±6,0 ^b	55,0±22,9 ^{ab}	47,4±18,0 ^{ab}	61,0±17,0 ^a	42,1±7,9 ^b			<0,001	0,008	0,051			
Glutathion (µmol/l)	3,91±0,86	3,88±1,64	4,41±1,6	3,63±1,87	4,37±2,18	3,94±1,57	4,55±2,14			0,74	0,61	0,59			
TBA-RS (µmol/g TG)	2,75±0,89	3,48±1,21	3,43±0,57	4,15±0,91	3,03±0,46	4,03±1,57	2,95±0,87			0,18	0,052	0,39			
PC (nmol/mg Protein) ⁵	1,57±0,36	1,26±0,21	1,25±0,15	1,26±0,16	1,23±0,14	1,24±0,07	1,27±0,19			0,001	0,93	0,99			

¹ Es wird der Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt (n=6/Gruppe), ² Methioninzulage in % der Ration, ³ P-Werte: K= Methioninkonzentration, ⁴ die Methioninquelle DLM wies signifikant höhere Glutathion-Konzentrationen auf im Vergleich zur Methioninquelle MHA, ⁵ Die Kontrollgruppe war signifikant unterschiedlich zu allen Methioningruppen, wenn im Post-hoc-Test nur die Methioninkonzentration betrachtet wurde; Q= Methioninquelle; der Versuchsdurchgang wurde statistisch mit einbezogen, ist hier aber nicht dargestellt ; PC= Proteincarbonyl, TBA-RS= Thiobarbitursäure reaktive Substanzen, TG= Triglyceride

Tabelle 39: Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die Konzentration von Glutathion, Tocopherol, TBA-RS und Proteincarbonyle im Lebergewebe nach der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35)¹

Methioninzulage ²	0		0,1		0,25		0,4		P-Werte ³	
	Kontrolle	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	K	Q	Q*K
Starter (Tag 10)										
Tocopherol (µmol/g TG) ⁴	1,05±0,12	2,01±0,53	1,67±0,54	1,58±0,54	1,77±0,66	1,48±0,38	1,58±0,54	0,009	0,96	0,48
Glutathion (µmol/l)	2,74±0,96 ^{ab}	2,86±0,68 ^{ab}	2,39±0,42 ^b	3,01±0,53 ^{ab}	3,08±0,85 ^{ab}	3,69±0,74 ^a	3,19±0,67 ^{ab}	0,007	0,16	0,49
TBA-RS (µmol/g TG) ⁵	0,40±0,10	1,06±0,62	0,66±0,20	1,00±0,86	0,51±0,17	0,67±0,39	0,53±0,28	0,10	0,043	0,46
PC (nmol/mg Protein)	7,93±0,92	8,63±1,45	8,37±0,79	8,51±1,29	8,48±0,82	9,12±0,54	7,98±0,86	0,67	0,26	0,51
Grower (Tag 21)										
Tocopherol (µmol/g TG) ⁶	1,32±0,29	2,10±0,91	2,24±0,65	2,82±0,70	2,53±0,71	1,80±0,46	3,15±1,05	0,018	0,26	0,14
Glutathion (µmol/l)	1,41±0,36 ^c	2,08±1,14 ^b	1,79±0,31 ^b	2,30±0,77 ^{ab}	2,30±0,60 ^{ab}	2,54±1,10 ^a	2,84±0,46 ^a	<0,001	0,93	0,13
TBA-RS (µmol/g TG)	0,61±0,61	1,30±0,88	0,99±0,65	1,57±1,05	1,16±0,42	0,98±0,56	1,30±0,86	0,28	0,61	0,51
PC (nmol/mg Protein)	8,90±1,64	8,82±0,83	8,85±0,75	8,41±1,12	9,30±1,05	8,54±1,30	9,23±1,61	1,00	0,25	0,72
Finisher (Tag 35)										
Tocopherol (µmol/g TG) ⁷	1,55 ± 0,93	2,07 ± 0,38	2,58 ± 1,09	3,94 ± 0,90	2,24 ± 0,91	2,64 ± 1,97	3,02 ± 0,55	0,041	0,51	0,18
Glutathion (µmol/l)	1,43 ± 0,68 ^b	2,06 ± 0,77 ^{ab}	1,78 ± 0,40 ^{ab}	2,12 ± 0,56 ^a	2,39 ± 1,03 ^a	2,57 ± 0,62 ^a	2,68 ± 0,42 ^a	0,002	0,89	0,80
TBA-RS (µmol/g TG)	2,55 ± 2,21	2,84 ± 1,62	2,24 ± 1,43	3,96 ± 2,21	1,94 ± 0,81	2,28 ± 1,41	2,63 ± 1,20	0,99	0,15	0,19
PC (nmol/mg Protein)	11,6 ± 1,9 ^a	10,9 ± 1,2 ^{ab}	10,6 ± 2,0 ^{ab}	11,0 ± 0,9 ^{ab}	9,7 ± 1,4 ^{ab}	9,4 ± 1,3 ^b	9,6 ± 2,1 ^b	<0,001	0,20	0,30

¹ Es wird der Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt (n=6/Gruppe), ² Methioninzulage in % der Ration, ³ P-Werte: K= Methioninkonzentration Q= Methioninquelle; der Versuchsdurchgang wurde statistisch mit einbezogen, ist hier aber nicht dargestellt; ⁴ Die Kontrollgruppe war signifikant unterschiedlich zu den Gruppen mit 0,1% und 0,25% Methionin, wenn im Post-hoc-Test nur die Methioninkonzentration betrachtet wurde; ⁵ die Methioninquelle DLM wies signifikant höhere TBA-RS-Konzentrationen auf im Vergleich zur Methioninquelle MHA, ⁶ Die Kontrollgruppe war signifikant unterschiedlich zu den Gruppen mit 0,25% und 0,4% Methionin, wenn im Post-hoc-Test nur die Methioninkonzentration betrachtet wurde; ⁷ Die Kontrollgruppe war signifikant unterschiedlich zu den Gruppen mit 0,25% Methionin, wenn im Post-hoc-Test nur die Methioninkonzentration betrachtet wurde; PC= Proteincarbonyl, TBA-RS= Thiobarbitursäure reaktive Substanzen, TG= Triglyceride

Ergebnisse

Tabelle 40: Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die Konzentration von Tocopherol im Nierengewebe nach der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35)¹

Methioninzulage ²	0			0,1			0,25			0,4			P-Werte ³		
	Kontrolle	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	K	Q	Q*K	
Starter (Tag 10)															
Tocopherol (µmol/g TG)	4,77 ± 1,82	4,05 ± 2,50	4,04 ± 1,57	4,41 ± 2,98	5,14 ± 3,13	4,80 ± 2,39	5,21 ± 2,26	0,78	0,81	0,87					
Grower (Tag 21)															
Tocopherol (µmol/g TG)	4,15±2,56	2,24±0,93	4,55±0,82	2,90±1,83	1,80±0,71	3,51±1,85	3,29±1,42	0,11	0,61	0,14					
Finisher (Tag 35)															
Tocopherol (µmol/g TG)	1,17±0,52	1,25±0,44	2,45±1,11	2,93±1,07	1,63±0,69	1,82±1,04	1,21±0,43	0,054	0,49	0,037					

¹ Es wird der Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt (n=6/Gruppe), ² Methioninzulage in % der Ration, ³ P-Werte: K= Methioninkonzentration Q= Methioninquelle; der Versuchsdurchgang wurde statistisch mit einbezogen, ist hier aber nicht dargestellt; TG= Triglyceride

Tabelle 41: Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die Konzentration von Tocopherol und Glutathion in der Jejunummucosa nach der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35)¹

Methioninzulage ²		0		0,1		0,25		0,4		P-Werte ³		
Methioninquelle	Kontrolle	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	K	Q	Q*K
Starter (Tag 10)												
Tocopherol (µmol/g TG)	1,78±0,36 ^b	2,34±0,60 ^b	2,54±0,86 ^b	1,83±0,65 ^b	2,63±0,63 ^b	1,70±0,33 ^b	4,40±1,40 ^a			0,019	0,002	0,003
Glutathion (nmol/g)	363±117	362±37	362±77	363±62	324±154	348±116	317±71			0,86	0,61	0,98
Grower (Tag 21)												
Tocopherol (µmol/g TG)	3,68±1,10 ^a	1,98±0,38 ^b	3,67±0,96 ^a	3,00±0,78 ^{ab}	3,00±1,17 ^{ab}	3,11±1,58 ^{ab}	2,55±0,61 ^{ab}			0,08	0,28	0,026
Glutathion (nmol/g)	127±116	217±68	230±52	131±24	175±116	138±71	157±116			0,10	0,70	0,94
Finisher (Tag 35)												
Tocopherol (µmol/g TG) ⁴	1,50±0,60 ^b	2,81±1,33 ^{ab}	3,23±0,87 ^{ab}	3,58±1,53 ^a	3,22±0,66 ^{ab}	3,35±1,85 ^{ab}	2,99±1,27 ^{ab}			<0,001	0,56	0,57
Glutathion (nmol/g)	112±137	111±84	174±93	111±101	144±30	148±78	148±115			0,66	0,28	0,70

¹ Es wird der Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt (n=6/Gruppe), ² Methioninzulage in % der Ration, ³ P-Werte: K= Methioninkonzentration Q= Methioninquelle; der Versuchsdurchgang wurde statistisch mit einbezogen, ist hier aber nicht dargestellt; ⁴ Die Kontrollgruppe war signifikant unterschiedlich zu allen Methioningruppen, wenn im Post-hoc-Test nur die Methioninkonzentration betrachtet wurde; TG= Triglyceride

5.3.2 Antioxidative Enzyme

5.3.2.1 Genexpression

Die Genexpression der GPx7, CAT, SOD1 wurde im Leber- und Nierengewebe sowie in der Jejunummucosa mittels qPCR gemessen. Um die relativen Werte anzugeben, wurden die Ergebnisse der Genexpression in der Kontrollgruppe nach der Starter-Phase auf den Wert 1 gesetzt und die Ergebnisse der anderen Gruppen darauf bezogen.

Im Lebergewebe war sowohl nach der Grower- und Finisher-Phase bei keinem der drei Gene (GPx7, CAT und SOD1) als auch nach der Starter-Phase bei den Genen CAT und SOD1 keine Effekte auf die mRNA-Konzentrationen zwischen den sieben Versuchsgruppen festzustellen. Lediglich bei GPx7 zeigte sich nach Tag 10 ein signifikanter Effekt der Methioninquellen. Die Gruppen mit DLM-Zulage wiesen dabei eine stärkere Genexpression von GPx7 auf als die Gruppen mit MHA-Zulage (Tabelle 42).

Die Genexpression von GPx7, CAT und SOD1 im Nierengewebe wurde gar nicht durch die Methioninquelle und nur teilweise durch die Methioninkonzentration beeinflusst. Nach Tag 10 zeigte lediglich die mRNA-Konzentration der SOD1 einen signifikanten Effekt der Methioninkonzentration (Tabelle 43). Im Post- hoc- Test der statistischen Auswertung wurde diese Signifikanz aber nur sichtbar, wenn man ausschließlich die Methioninkonzentration betrachtete. Dies ist im Anhang (Abbildung 33) dargestellt. Nach Tag 21 waren keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Konzentrationen festzustellen. Nach Tag 35 wies die mRNA- Konzentration der GPx7 einen signifikanten Effekt der Methioninkonzentration auf. Im Post- hoc- Test waren diesbezüglich aber keine Signifikanzen zu erkennen. Bei der Genexpression der SOD1 nach Tag 35 zeigte sich ein signifikanter Interaktionseffekt, aber auch hier gab es keine Signifianzen im Post- hoc- Test. Die Zulage von 0,1% MHA führte dabei zu einer deutlich höheren mRNA-Konzentration der SOD1 im Vergleich zu einer entsprechenden Zulage von DLM, während die Supplementierung von MHA in den Zulagestufen 0,25% zu niedrigeren bzw. 0,4% zu annähernd gleichen mRNA-Konzentrationen im Vergleich zu DLM führte (Tabelle 43). Bei der Genexpression der CAT gab es nach der Finisher- Phase keine signifikanten Unterschiede.

In der Jejunummucosa wurde neben GPx7, CAT und SOD1 auch die Genexpression der Darm-spezifische GPx2 gemessen (Tabelle 44). Nach der Starter-Phase zeigten

Ergebnisse

sich signifikante Unterschiede bei den Enzymen CAT und SOD1 bezüglich der Methioninkonzentration. Die mRNA-Konzentration der CAT war in der Kontrollgruppe signifikant höher im Vergleich zu den Gruppen mit 0,25% und 0,4% Methionin. Die mRNA-Konzentration der SOD1 war in der Kontrollgruppe signifikant höher als in den Gruppen mit 0,1% Methioninzulage und sogar höher als in allen Gruppen mit Methioninzulage, wenn man im Post-hoc-Test der statistischen Auswertung ausschließlich die Methioninkonzentration betrachtete. In Bezug auf die Methioninquelle gab es keinerlei Unterschiede. Die Genexpression der Enzyme GPx7 und GPx2 wies nach der Starter-Phase keine signifikanten Unterschiede zwischen den sieben Versuchsgruppen auf (Tabelle 44).

Nach der Grower-Phase (Tag 21) war lediglich die mRNA-Konzentration der SOD1 in der Kontrollgruppe signifikant höher als in allen Gruppen mit Methioninzulage, wenn man nur die Methioninkonzentration betrachtete. Bei den anderen drei Enzymen und auch zwischen den beiden Methioninquellen gab es in der Jejunummucosa keine signifikanten Unterschiede nach der Grower-Phase (Tabelle 44).

Sowohl bei GPx7 als auch GPx2 zeigten sich teils signifikante Unterschiede zwischen den sieben Versuchsgruppen nach der Finisher-Phase (Tag 35) (Tabelle 44). Die Kontrollgruppe wies signifikant höhere relative mRNA-Konzentrationen der GPx7 im Vergleich zu den Gruppen MHA 0,25 und MHA 0,4 auf und sogar zu allen Gruppen mit Methioninzulage, wenn man nur die Methioninkonzentration betrachtete. Dies ist im Anhang (Abbildung 34) dargestellt. Das Gen der GPx2 wurde in der Kontrollgruppe und in den Gruppen mit 0,1% Methionin signifikant stärker exprimiert im Vergleich zu den Gruppen mit 0,25% Methionin (Abbildung 35). Die mRNA-Konzentration der SOD1 und CAT wiesen nach der Finisher-Phase keine Unterschiede zwischen den sieben Versuchsgruppen auf und auch zwischen den beiden Methioninquellen waren, wie nach den ersten beiden Fütterungsphasen auch, keine signifikanten Unterschiede festzustellen (Tabelle 44).

Ergebnisse

Tabelle 42: Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die relative mRNA- Konzentration der Zielgene im Lebergewebe nach der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35)¹

Methioninzulage ²	0	0,1			0,25			0,4			P-Werte ³		
Methioninquelle	Kontrolle	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	K	Q	Q*K	
Starter (Tag 10)													
GPx7 ⁴	1,00±0,10	1,12±0,43	1,19±0,30	1,38±0,23	0,93±0,21	1,37±0,44	0,94±0,39	0,77	0,045			0,09	
CAT	1,00±0,20	1,16±0,32	0,91±0,34	1,06±0,20	1,12±0,23	1,41±0,36	1,08±0,17	0,17	0,11			0,34	
SOD1	1,00±0,24	1,05±0,19	1,10±0,24	0,85±0,26	0,90±0,17	1,12±0,21	0,89±0,26	0,20	0,65			0,36	
Grower (Tag 21)													
GPx7	1,24±0,28	1,11±0,36	1,33±0,29	1,34±0,48	1,19±0,36	1,26±0,27	1,31±0,58	0,95	0,79			0,63	
CAT	1,14±0,28	1,38±0,37	1,46±0,35	1,49±0,26	1,52±0,27	1,53±0,44	1,18±0,30	0,07	0,85			0,35	
SOD1	1,09±0,33	1,15±0,16	1,01±0,25	1,07±0,24	1,11±0,27	1,11±0,35	1,00±0,22	0,85	0,66			0,87	
Finisher (Tag 35)													
GPx7	1,18±0,40	0,85±0,24	1,15±0,47	1,50±0,70	1,34±0,32	1,16±0,44	1,86±0,85	0,08	0,21			0,40	
CAT	1,51±0,59	1,97±0,59	1,69±0,28	2,29±0,68	1,99±0,59	1,97±0,63	1,95±0,49	0,12	0,58			0,95	
SOD1	1,33±0,24	1,08±0,23	1,22±0,33	1,16±0,18	1,14±0,12	1,33±0,42	1,50±0,32	0,17	0,36			0,84	

¹ es werden die relativierten Mittelwerte ± relativierte Standardabweichung dargestellt (die relativen Werte beziehen sich auf die Kontrollgruppe an Tag 10) (n=6/Gruppe); ² Methioninzulage in % der Ration, ³ P-Werte: K= Methioninkonzentration, Q= Methioninquelle, der Versuchsdurchgang wurde statistisch mit einbezogen, ist hier aber nicht dargestellt; ⁴ die Methioninquelle DLM führte zu einer signifikant höheren Genexpression im Vergleich zu MHA; Abkürzungen: GPx7= Glutathionperoxidase, CAT= Katalase, SOD1= Superoxidperoxidase

Ergebnisse

Tabelle 43: Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die relative mRNA-Konzentration der Zielgene im Nierengewebe nach der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35)¹

Methioninzulage ²	0	0,1			0,25			0,4			P-Werte ³		
Methioninquelle	Kontrolle	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	K	Q	Q*K	
Starter (Tag 10)													
GPx7	1,00±0,88	1,45±1,10	1,27±1,12	1,87±1,56	0,94±0,57	1,05±0,78	1,46±0,86			0,36	0,54	0,20	
CAT	1,00±0,20	1,02±0,28	1,00±0,13	1,02±0,11	0,89±0,09	0,97±0,24	0,83±0,16			0,42	0,24	0,60	
SOD1 ⁴	1,00±0,12	1,19±0,21	1,06±0,11	0,95±0,05	0,94±0,14	0,95±0,17	1,03±0,17			0,049	0,54	0,33	
Grower (Tag 21)													
GPx7	0,98±0,67	1,10±0,94	1,45±0,66	1,69±1,34	1,44±0,90	1,27±0,70	1,49±1,29			0,65	0,73	0,98	
CAT	1,20±0,30	1,30±0,23	1,11±0,31	1,10±0,13	1,22±0,22	1,21±0,21	1,40±0,30			0,74	0,83	0,39	
SOD1	1,30±0,21	1,23±0,28	1,24±0,18	1,12±0,14	1,14±0,14	1,20±0,18	1,19±0,14			0,37	0,97	0,99	
Finisher (Tag 35)													
GPx7	0,69±0,26	1,05±0,35	1,08±0,54	0,64±0,23	1,02±0,61	1,29±0,65	0,79±0,37			0,045 ⁵	0,57	0,14	
CAT	1,90±0,67	1,69±0,68	1,45±0,29	1,78±0,55	1,47±0,19	1,89±0,29	1,52±0,44			0,22	0,15	0,48	
SOD1	1,19±0,27	1,11±0,23	1,53±0,28	1,26±0,23	1,08±0,15	1,28±0,18	1,37±0,23			0,20	0,28	0,048 ⁵	

¹ es werden die relativierten Mittelwerte ± relativierte Standardabweichung dargestellt (die relativen Werte beziehen sich auf die Kontrollgruppe an Tag 10) (n=6/Gruppe); ² Methioninzulage in % der Ration; ³ P-Werte: K= Methioninkonzentration, Q= Methioninquelle, der Versuchsdurchgang wurde statistisch mit einbezogen, ist hier aber nicht dargestellt; ⁴ Die Gruppen mit 0,1% Methionin waren signifikant unterschiedlich zu den Gruppen mit 0,25% Methionin, wenn im Post-hoc-Test nur die Methioninkonzentration betrachtet wurde ⁵ keine signifikanten Unterschiede im Post-hoc-Test; Abkürzungen: GPx7= Glutathionperoxidase, CAT= Katalase, SOD1= Superoxidperoxidase

Tabelle 44: Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die relative mRNA-Konzentration der Zielgene in der Jejunummucosa nach der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35)¹

Methioninzulage ²		0	0,1		0,25		0,4		P-Werte ³	
Methioninquelle	Kontrolle	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	K	Q	Q*K
Starter (Tag 10)										
GPx7	1,00±0,56	0,99±0,71	0,66±0,38	0,73±0,52	0,50±0,36	0,72±0,33	0,77±0,51	0,26	0,41	0,83
GPx2	1,00±0,71	0,73±0,49	0,49±0,35	0,44±0,12	0,47±0,21	0,62±0,29	0,35±0,11	0,17	0,28	0,82
CAT	1,00±0,22 ^a	0,81±0,25 ^{ab}	0,76±0,24 ^{ab}	0,65±0,23 ^b	0,72±0,27 ^b	0,64±0,24 ^b	0,61±0,30 ^b	0,006	0,99	0,93
SOD1 ⁴	1,00±0,36 ^a	0,52±0,24 ^b	0,59±0,20 ^b	0,75±0,35 ^{ab}	0,74±0,30 ^{ab}	0,79±0,37 ^{ab}	0,78±0,23 ^{ab}	0,001	0,85	0,99
Grower (Tag 21)										
GPx7	0,76±0,45	0,46±0,24	0,72±0,40	0,49±0,26	0,64±0,19	0,48±0,21	0,57±0,18	0,41	0,10	0,67
GPx2	0,50±0,14	0,45±0,35	0,52±0,32	0,37±0,24	0,33±0,09	0,29±0,17	0,31±0,09	0,10	0,57	0,99
CAT	1,19±0,31	1,02±0,34	0,90±0,24	1,17±0,34	1,20±0,57	1,37±0,54	1,11±0,49	0,29	0,33	0,94
SOD1	1,29±0,41 ^a	0,79±0,24 ^b	0,85±0,18 ^b	0,74±0,29 ^b	0,90±0,36 ^b	0,66±0,24 ^b	0,79±0,20 ^b	0,009	0,25	0,89
Finisher (Tag 35)										
GPx7 ⁴	0,60±0,20	0,59±0,16	0,51±0,17	0,34±0,04	0,36±0,20	0,40±0,23	0,57±0,13	0,017	0,62	0,37
GPx2 ⁵	1,03±0,16 ^a	0,44±0,17 ^{ab}	0,47±0,19 ^{ab}	0,39±0,19 ^{ab}	0,35±0,19 ^b	0,55±0,30 ^{ab}	0,38±0,25 ^b	0,001	0,41	0,71
CAT	1,93±1,39	1,83±0,19	1,23±0,43	1,44±0,33	1,42±0,30	1,30±0,44	1,51±0,51	0,61	0,49	0,27
SOD1	1,31±0,59	1,01±0,29	0,95±0,33	1,03±0,20	0,83±0,20	0,94±0,30	1,07±0,43	0,07	0,49	0,51

¹ es werden die relativierten Mittelwerte ± relativierte Standardabweichung dargestellt (die relativen Werte beziehen sich auf die Kontrollgruppe an Tag 10) (n=6/Gruppe); ² Methioninzulage in % der Ration, ³ P-Werte: K= Methioninkonzentration, Q= Methioninquelle, ⁴ Die Kontrollgruppe und 0,1% Methionin waren signifikant unterschiedlich zu den Gruppen mit 0,25% Methionin, wenn im Post-hoc-Test nur die Methioninkonzentration betrachtet wurde; ⁵ Die Kontrollgruppe war signifikant unterschiedlich zu allen Methioningruppen, wenn im Post-hoc-Test nur die Methioninkonzentration betrachtet wurde; Abkürzungen: GPx7= Glutathionperoxidase, GPx2= Glutathionperoxidase (intestinal), CAT= Katalase, SOD1= Superoxidperoxidase

5.3.2.2 Enzymaktivität

Neben der Genexpression wurde auch die Aktivität der Enzyme SOD, GPx und CAT in den Geweben gemessen. Sie werden in den folgenden Tabellen als U/ g Gewebe bzw U/ mg Gewebe dargestellt. Im Leber- und Nierengewebe wurde die Aktivität der SOD, GPx und CAT und in der Jejunummucosa die Aktivität der GPx und CAT gemessen.

Im Lebergewebe waren nach keiner der drei Fütterungsphasen signifikante Unterschiede bezüglich der Aktivität der drei gemessenen Enzyme festzustellen (Tabelle 45).

Nach der Starter- (Tag 10) und Finisher-Phase (Tag 35) konnten auch im Nierengewebe für keine der drei Enzyme Effekte zwischen den sieben Versuchsgruppen beobachtet werden (Tabelle 46). Nach der Grower-Phase kam es zu signifikanten Effekten der Methioninkonzentration bei SOD und CAT (Tabelle 46). Der Post- hoc- Test der statistischen Auswertung zeigte diese Signifikanzen jedoch nur bei ausschließlicher Betrachtung der Methioninkonzentration. Die Aktivität der SOD in der Niere war in der Kontrollgruppe signifikant höher als in den Gruppen mit 0,1% Methionin. Die Aktivität der CAT war hingegen in den Gruppen mit 0,25% und 0,4% signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Diese Effekte sind im Anhang (Abbildung 36 und Abbildung 37) graphisch dargestellt.

In der Jejunummucosa wiesen die Aktivitäten der GPx und der CAT nach der Starter-Phase und die Aktivität der GPx nach der Grower-Phase signifikante Effekte der Methioninkonzentration auf (Tabelle 47). Die Signifikanzen wurden im Post- hoc- Test der statistischen Auswertung jedoch nur bei alleiniger Betrachtung der Methioninkonzentration sichtbar. Diese Ergebnisse wurden im Anhang (Abbildung 38 und Abbildung 39) graphisch dargestellt.

Nach Tag 10 war die Aktivität der GPx in der Kontrollgruppe signifikant höher zu allen Gruppen mit Methioninzulage (Abbildung 38 A) und die Aktivität der CAT wies in den Gruppen mit 0,25% und 0,4% Methionin signifikant niedrigere Werte auf im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu den Gruppen mit 0,1% Methioninzulage (Abbildung 38 B).

Nach Tag 21 wies die GPx in der Jejunummucosa eine signifikant höhere Aktivität in der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Gruppen mit 0,1% und 0,4% Methionin auf (Abbildung 39). Die CAT-Aktivität zeigte nach der Grower-Phase, sowohl auf die

Ergebnisse

Methioninkonzentration als auch auf die Methioninquelle bezogen, keine Effekte zwischen den sieben Versuchsgruppe (Tabelle 47).

Nach der Finisher-Phase waren bezüglich der GPx-Aktivität in der Jejunummucosa keine Unterschiede zwischen den Gruppen zu sehen. Die Aktivität der CAT hingegen war nach der Finisher-Phase in der Kontrollgruppe signifikant höher als in allen Gruppen mit Methioninzulage (Tabelle 47). Zusätzlich zeigten auch die Gruppen mit 0,1% Methioninzulage eine signifikant höhere CAT-Aktivität im Vergleich zu den Gruppen mit 0,4% Methioninzulage, wenn nur die Methioninkonzentration in der statistischen Auswertung betrachtet wurde. Auch dies ist im Anhang (Abbildung 40) dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 45: Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die Aktivität der enzymatischen Enzyme im Lebergewebe nach der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35)¹

Methioninzulage ²	0		0,1		0,25		0,4		P-Werte ³	
	Kontrolle		DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	K	Q
Starter (Tag 10)										
SOD (U/mg Gewebe)	2,52±1,23		2,54±1,97	1,91±0,38	2,53±0,76	2,04±0,55	2,46±0,71	2,01±1,70	0,83	0,11
GPx (U/g Gewebe)	9,01±1,35		8,33±0,97	8,23±1,10	8,61±1,31	7,57±1,36	8,35±0,43	7,64±0,95	0,09	0,47
CAT (U/g Gewebe)	37,0±9,43		41,7±5,65	34,3±7,60	36,3±3,29	35,6±4,14	39,6±9,43	36,3±8,4	0,09	0,99
Grower (Tag 21)										
SOD (U/mg Gewebe)	2,94±1,67		3,41±2,72	4,19±2,29	3,05±1,37	3,52±1,09	2,85±1,28	2,70±0,87	0,47	0,58
GPx (U/g Gewebe)	10,8±1,51		11,5±2,34	11,9±2,10	11,4±2,20	11,3±1,72	12,2±2,66	11,0±3,19	0,34	0,47
CAT (U/g Gewebe)	30,5±9,24		36,0±9,07	34,8±4,14	35,8±5,94	37,5±7,10	34,2±6,01	34,3±8,80	0,23	0,96
Finisher (Tag 35)										
SOD (U/mg Gewebe)	2,96 ± 1,26		3,10 ± 0,65	3,11 ± 0,59	2,21 ± 0,73	3,15 ± 1,66	3,27 ± 1,36	2,90 ± 0,41	0,78	0,54
GPx (U/g Gewebe)	14,0 ± 3,3		16,9 ± 3,9	14,7 ± 2,8	15,5 ± 3,0	15,0 ± 3,3	14,2 ± 3,4	16,1 ± 5,3	0,15	0,68
CAT (U/g Gewebe)	38,9 ± 7,2		39,6 ± 7,5	35,0 ± 4,8	39,7 ± 5,7	41,3 ± 5,2	43,1 ± 6,1	43,1 ± 7,6	0,65	0,34

¹ Es wird der Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt (n=6/Gruppe), ² Methioninzulage in % der Ration, ³ P-Werte: K= Methioninkonzentration, Q= Methioninquelle, der Versuchsdurchgang wurde statistisch mit einbezogen, ist hier aber nicht dargestellt; Abkürzungen: GPx= Glutathionperoxidase, CAT= Katalase, SOD= Superoxidperoxidase

Tabelle 46: Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die Aktivität der enzymatischen Enzyme im Nierengewebe nach der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35) ¹

Methioninzulage ²	0	0,1			0,25			0,4			P-Werte ³		
Methioninquelle	Kontrolle	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	K	Q	Q*K	
Starter (Tag 10)													
SOD (U/mg Gewebe)	1,55 ± 1,28	0,58 ± 0,52	0,83 ± 1,04	1,34 ± 0,78	0,71 ± 0,56	1,46 ± 1,07	0,65 ± 0,65	0,12	0,35	0,44			
GPx (U/g Gewebe)	5,72 ± 0,61	6,41 ± 1,13	5,37 ± 0,45	5,81 ± 1,03	5,59 ± 0,55	5,87 ± 0,88	5,30 ± 1,39	0,71	0,07	0,46			
CAT (U/g Gewebe)	27,7 ± 4,8	26,0 ± 6,7	21,2 ± 3,6	28,9 ± 1,7	23,7 ± 7,5	22,5 ± 5,8	25,1 ± 5,4	0,23	0,29	0,19			
Grower (Tag 21)													
SOD (U/mg Gewebe) ⁴	1,45±0,85	0,65±0,39	0,70±0,57	0,64±0,66	1,08±0,42	0,93±0,47	1,24±0,78	0,038	0,29	0,85			
GPx (U/g Gewebe)	7,32±0,90	6,52±0,51	6,37±0,26	6,79±0,74	7,15±0,84	6,87±0,94	7,54±1,40	0,06	0,72	0,91			
CAT (U/g Gewebe) ⁵	23,2±5,0	29,5±7,1	24,6±4,7	30,1±4,3	31,3±5,3	30,4±4,4	32,7±4,5	<0,001	0,86	0,48			
Finisher (Tag 35)													
SOD (U/mg Gewebe)	1,97±1,20	1,44±0,44	1,80±0,34	1,26±0,28	1,67±0,32	1,85±0,53	1,37±0,53	0,43	0,77	0,46			
GPx (U/g Gewebe)	8,75±1,17	8,22±0,62	7,94±0,82	8,07±0,98	8,09±0,82	8,22±0,87	7,95±0,71	0,06	0,47	0,88			
CAT (U/g Gewebe)	35,9±2,7	32,5±4,4	32,8±6,1	34,3±4,5	32,1±3,6	35,6±4,4	31,8±4,6	0,36	0,22	0,78			

¹ Es wird der Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt (n=6/Gruppe), ² Methioninzulage in % der Ration, ³ P-Werte: K= Methioninkonzentration, Q= Methioninquelle, der Versuchsdurchgang wurde statistisch mit einbezogen, ist hier aber nicht dargestellt; ⁴ Die Kontrollgruppe war signifikant unterschiedlich zu den Gruppen mit 0,1% Methionin, wenn im Post-hoc-Test nur die Methioninkonzentration betrachtet wurde; ⁵ Die Kontrollgruppe war signifikant unterschiedlich zu den Gruppen mit 0,25% und 0,4% Methionin, wenn im Post-hoc-Test nur die Methioninkonzentration betrachtet wurde; Abkürzungen: GPx= Glutathionperoxidase, CAT= Katalase, SOD= Superoxidperoxidase

Tabelle 47: Auswirkungen der Supplementierung von DLM und MHA in drei Zulagehöhen auf die Aktivität der enzymatischen Enzyme in der Jejunummucosa nach der Starter- (Tag 1-10), Grower- (Tag 11-21) und Finisher-Phase (Tag 22-35) ¹

Methioninzulage ²	0	0,1		0,25		0,4		P-Werte ³		
Methioninquelle	Kontrolle	DLM	MHA	DLM	MHA	DLM	MHA	K	Q	Q*K
Starter (Tag 10)										
GPx (U/g Gewebe) ⁴	1,31±0,84	0,71±0,31	0,54±0,32	0,77±0,59	0,74±0,31	0,84±0,46	0,72±0,19	0,006	0,48	0,93
CAT (U/g Gewebe) ⁵	14,3±4,0	15,9±1,5	13,4±2,0	11,9±2,4	10,2±1,9	11,4±2,4	11,3±2,3	<0,001	0,23	0,74
Grower (Tag 21)										
GPx (U/g Gewebe) ⁶	1,33±0,48	0,78±0,26	0,74±0,45	1,07±1,05	1,04±0,85	0,86±0,26	0,85±0,46	0,003	0,47	0,74
CAT (U/g Gewebe)	16,3±4,2	16,3±4,0	14,7±3,0	13,6±2,2	14,3±3,7	20,1±11,0	16,4±5,6	0,34	0,76	0,98
Finisher (Tag 35)										
GPx (U/g Gewebe)	2,11±1,24	2,15±1,21	1,95±0,60	2,02±0,71	1,63±0,57	1,49±0,48	1,61±0,24	0,19	0,55	0,80
CAT (U/g Gewebe) ⁷	33,9±11,8 ^a	22,7±2,9 ^b	20,2±3,3 ^b	17,5±2,5 ^b	19,8±3,7 ^b	17,6±4,9 ^b	15,7±3,7 ^b	<0,001	0,82	0,34

¹ Es wird der Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt (n=6/Gruppe), ² Methioninzulage in % der Ration, ³ P-Werte: K= Methioninkonzentration, Q= Methioninquelle, der Versuchsdurchgang wurde statistisch mit einbezogen, ist hier aber nicht dargestellt; ⁴ Die Kontrollgruppe war signifikant unterschiedlich zu allen Methioningruppen, wenn im Post-hoc-Test nur die Methioninkonzentration betrachtet wurde; ⁵ Die Kontrollgruppe war signifikant unterschiedlich zu den Gruppen mit 0,25% und 0,4% Methionin, wenn im Post-hoc-Test nur die Methioninkonzentration betrachtet wurde; ⁶ Die Kontrollgruppe war signifikant unterschiedlich zu den Gruppen mit 0,1% und 0,4% Methionin, wenn im Post-hoc-Test nur die Methioninkonzentration betrachtet wurde; ⁷ Die Kontrollgruppe war signifikant unterschiedlich zu allen Methioningruppen und die Gruppen mit 0,1% Methionin unterschiedlich zu der Gruppen mit 0,4% Methionin, wenn im Post-hoc-Test nur die Methioninkonzentration betrachtet wurde; Abkürzungen: GPx= Glutathionperoxidase, CAT= Katalase

6 Diskussion

Methionin ist als erstlimitierende Aminosäure beim Geflügel ein wichtiger Faktor in der kommerziellen Broilermast. Der Methionineinsatz hat in der Geflügelfütterung eine wichtige wirtschaftliche Bedeutung und ist daher auch immer wieder Bestandteil von Forschungsprojekten. Die beiden Methioninquellen DLM und MHA wurden in der Vergangenheit bereits vielfach untersucht und besonders hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Leistungsdaten und ihrer Bioeffizienz verglichen (Sauer et al. 2008, Zou et al. 2015 und Zhang et al. 2016). In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss dieser beiden Methioninquellen, bei unterschiedlicher Zulagehöhe im Besonderen auf den oxidativen Status beim Broiler untersucht. Für den Versuch wurden insgesamt 336 männliche Broiler der Zuchtlinie Cobb500 in 7 Versuchsgruppen (Kontrollgruppe, DLM 0,1, DLM 0,25, DLM 0,40, MHA 0,1, MHA 0,25 und MHA 0,40) aufgeteilt. Die Versuchszeit von 35 Tagen wurde in die Phasen Starter (Tag 1-10), Grower (Tag 11-21) und Finisher (Tag 22-35) unterteilt und in 3 Versuchsdurchgängen wiederholt. Wie auch in den Studien von Lemme et al. (2002) und Zou et al. (2015), lagen in der Fütterungsration der Kontrollgruppe Energie und Nährstoffe in ausreichender Menge vor, um den Erhaltungs- und Wachstumsbedarf der Tiere zu decken. Ausschließlich die Konzentration an Methionin lag in der Kontrollgruppe unter den Empfehlungen der NRC (1994). In den Versuchsgruppen mit Methioninzulage entsprach der Gehalt an Methionin den Empfehlungen (Gruppen DLM 0,1 und MHA 0,1) oder lag sogar darüber (Gruppen DLM 0,25, DLM 0,4, MHA 0,25 und MHA 0,4). Dementsprechend waren in diesem Versuch eigentlich die Gruppen mit 0,1% Methioninzulage die bedarfsgerechten bzw. „Kontrollgruppen“. Die Kontrollgruppe, die leicht unter Bedarf mit Methionin versorgt wurde, wurde dennoch benötigt, um zu sehen wie diese sich im Vergleich zur bedarfsgerechten Methioninzulage von 0,1% auswirkt. Zusätzlich gab es im Versuchsaufbau der vorliegenden Studie die Gruppen mit 0,25% und 0,4% Methioninzulage, um zu prüfen ob bzw. welchen Nutzen eine Methioninversorgung über die Empfehlungen hinaus im Vergleich zu einer empfohlenen Methionin- Supplementierung hatte.

Nach der Darstellung der Versuchsergebnisse sollen diese nun folgend, unter Einbeziehung bereits bekannter Ergebnisse aus der Literatur, eingeordnet und diskutiert werden.

6.1 Einfluss der verschiedenen Methioninquellen und -konzentrationen auf die Leistungs- und Schlachtkörperdaten der Broiler

Bei fast allen Leistungsmerkmalen (Endgewichte, Futteraufnahme und Futterverwertung) und auch Schlachtkörperdaten (Schlachtgewicht, Ausschachtung, relatives Brustmuskelgewicht und die relativen Gewichte von Leber, Niere, Jejunum und abdominalem Fettgewebe) zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Methioninkonzentrationen in allen Fütterungsphasen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Methioninquellen war hingegen nur beim Brustmuskelgewicht in Relation zum Schlachtgewicht nach der Finisher- Phase zu sehen.

6.1.1 Einfluss auf die Leistungsparameter

Wie oben bereits erwähnt, wies die Kontrollgruppe bei allen Leistungsparametern signifikant niedrigere Werte bezogen auf die Futterverwertung im Vergleich zu allen Gruppen mit Methioninzulage auf. Diese Ergebnisse waren aufgrund des Methioninmangels in der Kontrollgruppe zu erwarten. Diese Beobachtungen beschrieben auch schon Willemsen et al. (2011), Zou et al. (2015), Swennen et al. (2011), Lemme et al. (2002) und Payne et al. (2006) in ihren Studien. Dieser Effekt verdeutlichte, dass das Wachstumspotential der Broiler nicht völlig ausgeschöpft werden konnte, wenn eine essentielle Aminosäure in zu geringer Menge im Futter enthalten war (Moughan et al. 2014 und Métayer et al. 2008). Hinzu kommt, dass Methionin, anders als bei anderen landwirtschaftlichen Nutztieren, die erstlimitierende Aminosäure beim Geflügel darstellt und somit besonders wichtig für die Protein- und Federsynthese sowie die Immunkompetenz ist (Swennen et al. 2011). Die erstlimitierende Aminosäure in einem Tier entscheidet über die Verwertung des Nahrungsproteins für den Aufbau von Körperprotein. Die fehlende Aminosäure

begrenzt also die Proteinbiosynthesekapazität. In typischen proteinreduzierten Futterrationen sind die Basisgehalte an Methionin in den Futtermitteln nicht ausreichend, daher ist eine Supplementierung nötig (Liu et al. 2004).

Bei einem Großteil der Leistungsdaten war die Kontrollgruppe zwar signifikant unterschiedlich zu den anderen Gruppen, die Gruppen mit unterschiedlichen Methionin- Zulagestufen waren untereinander jedoch gleich. Nur nach der Finisher- Phase wies die Gruppe MHA 0,4 beim Endkörpergewicht und bei der Gewichtszunahme zusätzlich signifikant höhere Werte im Vergleich zur Gruppe DLM 0,1 auf. Die Methioninversorgung über die Empfehlungen hinaus hatte auf diese Parameter und Mastphase bezogen also einen positiven Effekt.

Willemsen et al. (2011) untersuchten die Auswirkungen einer Methionin-Supplementierung mit DLM bzw. MHA bei Broilern, die Hitzestress ausgesetzt waren im Vergleich zu einer normalen Umgebungstemperatur. In dieser Studie konnten die genannten Autoren beobachten, dass das Gewicht der Broiler ohne Hitzestress bis zur 5. Woche in gleicher Weise anstieg, unabhängig von der Methioninquelle. Erst zwischen der 5. und 6. Woche stieg das Gewicht der Tiere, die mit MHA gefüttert wurden, signifikant stärker an als bei der DLM-Supplementierung. Der gleiche Effekt war auch unter Hitzestress festzustellen. Hierbei gingen die höheren Gewichte der MHA-supplementierten Broiler mit höheren *Insulin-like growth factor 1* (IGF- 1)- Konzentrationen im Plasma einher. IGF-1 ist ein Wachstumsfaktor im Geflügelorganismus und somit wahrscheinlich verantwortlich für die besseren Wachstumsleistungen (Buyse & Decuyper 1999).

Die Unterschiede in der Bioeffizienz der beiden Methioninquellen DLM und MHA wurde in den letzten Jahrzehnten vielfach diskutiert (Kratzer & Littell 2006 und Bunchasak 2009). Die vorliegende Studie war hingegen nicht darauf ausgelegt und hatte somit auch nicht zum Ziel die Bioeffizienz von DLM und MHA zu vergleichen. Dieser Aspekt war somit für unsere Hypothese nicht relevant, dennoch werden im Folgenden die bekannten Ergebnisse anderer Studien kurz diskutiert.

Studien wie z.B. die von Sauer et al. (2008) und Payne et al. (2006) zeigten, dass MHA eine niedrigere Bioeffizienz auf äquimolarer Basis aufweist als DLM. Beide Untersuchungen bezogen sich dabei sowohl auf die Futterverwertung als auch auf die

Diskussion

Gewichtszunahme. Andere Studien beschreiben hingegen keinerlei Unterschiede in der Bioeffizienz der beiden Methioninquellen (Dänner & Bessei 2002). Die Ergebnissen von Esteve- Garcia & Llauro (1997) zeigten zwar tendenziell eine bessere Bioeffizienz des DLM, diese waren allerdings in den meisten Fällen nicht signifikant.

Die niedrigere Bioeffizienz ist durch die unterschiedliche Absorption von MHA und DLM zu erklären (Mitchell & Lemme 2008). Während die Resorption des DLM aus dem Darmlumen schneller abläuft, wird MHA langsamer resorbiert und ist den Darmbakterien somit länger ausgesetzt, was den Resorptionsprozess hemmt (Drew et al. 2003). 10-20% des MHA im Futter verbleiben im distalen Teil des Dünndarms der Broiler. Beim DLM sind es hingegen nur 4-5% (Powell et al. 2015). Außerdem beeinflusst die Transformation der Methioninquellen in das metabolisch aktive L- Methionin die Bioeffizienz (Martín-Venegas et al. 2006). Im Gegensatz zum DLM, bei dem nur das D- Isomer in L- Methionin umgewandelt werden muss, müssen beide Isomere des MHA transformiert werden (Farke 2011). Diese Umwandlung beginnt bereits im Darm (Martín-Venegas et al. 2013). Laut Dibner & Knight (1984) können beiden MHA- Isomere in gleichem Maße zu L- Methionin umgesetzt werden wie das D- Isomer des DLM.

Vázquez-Añ et al. (2006) begründeten die unterschiedlichen Bioeffizienzen von DLM und MHA durch ihre verschiedenen Dosis- Wirkungs- Formen. MHA übertrifft DLM in seiner Wirkung, wenn schwefelhaltige Aminosäuren in adäquater Menge vorhanden sind. DLM weist hingegen signifikant höhere Werte bezüglich der Bioeffizienz auf, wenn ein Defizit an schwefelhaltigen Aminosäuren vorliegt. Auch dieser Aspekt ist teilweise auf die unterschiedliche Absorption und Metabolisierung beider Moleküle im Gewebe zurückzuführen. Ein höherer Spiegel an freiem Methionin im Plasma, nach einer Supplementation mit schwefelhaltigen Aminosäuren im Bereich des maximalen Nutzen, ließ auf einen langsameren Metabolismus des D- Isomers des DLM und folglich eine niedrigere Futteraufnahme und Gewichtszunahme im Vergleich zu MHA schließen (Vázquez-Añ et al. 2006).

Mögliche Parameter, die die Effektivität der Methioninquellen in Bezug auf die Futteraufnahme und die Gewichtszunahme beeinflussen können, sind z.B. die Art des Futters oder die Umgebungstemperatur. So zeigte sich beispielsweise in Studien, in denen gereinigte kristalline Aminosäuren gefüttert wurden, eine größere und

kontinuierlichere Wirksamkeit des DLM im Vergleich zum MHA. Im Gegensatz dazu war der Unterschied der Broilerleistung zwischen DLM und MHA bei einer konventionellen Fütterung meistens sehr klein (Balnave & Brake 2004). In Studien, die DLM und MHA in einer konventionellen Fütterung und zusätzlichem Hitzestress verglichen, zeigte sich eine bessere Wirkung des MHA (Willemsen et al. 2011). Interessanterweise spielt auch das Arginin:Lysin (Arg:Lys)- Verhältnis in der Fütterungsration der Broiler eine wichtige Rolle. Tiere, die Hitzestress ausgesetzt waren, reagierten positiver auf eine Supplementation mit DLM, wenn das Arg:Lys- Verhältnis niedrig war (1,05). Bei einem höheren Arg:Lys- Verhältnis (1,35) zeigte sich hingegen bei einer MHA- Supplementation die bessere Wirkung (Balnave & Brake 2004).

6.1.2 Einfluss auf das Brustmuskelgewicht

Die Ergebnisse zeigten einen deutlichen Einfluss der Methioninkonzentration auf die Brustmuskelgewichte der Broiler. Während nach der Starter- Phase tendenziell schon höhere Brustmuskelgewichte aus steigenden Zulagehöhen resultierten, waren die Werte der Kontrollgruppe nach der Grower- und Finisher- Phase signifikant niedriger im Vergleich zur Gruppe DLM 0,1. Zusätzlich führte eine Zulage mit 0,4% Methionin nach dem 35. Tag zu signifikant höheren Brustmuskelgewichten im Vergleich zur Gruppe MHA 0,1. Demzufolge hatte eine Methioninzulage über die Empfehlungen hinaus teilweise zusätzlich einen positiven Effekt auf das Brustmuskelwachstum. Enthielt die Broilerration hingegen Methionin geringfügig unter dem empfohlenen Bedarf, führte dies schon zu niedrigeren Brustmuskelgewichten verglichen mit einer bedarfsgerechten Methioninversorgung.

Nach der Finisher- Phase gab es zusätzlich einen signifikanten Effekt zwischen den Methioninquellen. Bei einer Methioninzulage von 0,1% führte die Supplementation mit DLM zu signifikant höheren Brustmuskelgewichten als die Zulage von MHA.

Dem entsprechende Ergebnisse beschrieben auch schon Esteve-Garcia & Llauradó (1997). Die Brustmuskelgewichte der Broiler in der genannten Studie stiegen mit ansteigender Methioninkonzentration und die Zulage von DLM führte, vor allem in niedrigen Zulagestufen (0,5 und 1g/kg) zu höheren Gewichten im Vergleich zu MHA.

Im Gegensatz dazu fanden Barnes et al. (1995) und Zou et al. (2015) in ihren Studien heraus, dass es keine Unterschiede zwischen den Methioninquellen hinsichtlich des Brustmuskelansatzes bzw. des Wachstums der Skelettmuskulatur gab. In beiden Studien wurden jedoch im Vergleich zu Esteve-Garcia & Llauroadó (1997) relative hohe Methioninzulagen verwendet (Barnes: 2,02 bzw. 2,27 g/kg; Zou: 1,2- 3,6 g/kg). Daraus lässt sich schließen, dass DLM zwar in niedrigen Zulagestufen eine bessere Wirksamkeit aufweist, sich MHA aber ab einer bestimmten Methioninmenge der Effizienz des DLM angleicht. Außerdem sind die unterschiedlichen Ergebnisse, wie schon in 6.1.1 erwähnt, durch verschiedene Umweltfaktoren, wie die Temperatur oder die Art des Futters, die dem entsprechenden Versuchsaufbau zugrunde liegen, zu begründen.

Trotz der unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Methioninquelle, hatten viele Studien mit der vorliegenden Arbeit gemeinsam, dass die Supplementation mit Methionin, unabhängig von der Quelle, zu signifikant höheren Brustmuskelgewichten im Vergleich zur Kontrollgruppe führte (Lemme et al. 2002; Esteve-Garcia & Llauroadó 1997; Zou et al. 2015).

Daraus lässt sich schließen, dass eine ausreichende Supplementation von Methionin ausschlaggebend für ein adäquates Muskelwachstum ist, wenn Methionin die erstlimitierende Aminosäure darstellt (Zou et al. 2015). Dies ist vor allem durch die Funktion als proteinogene Aminosäure zu erklären. Außerdem ist Methionin in der Lage, das Protein *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) im Säugetier zu aktivieren, welches ein wichtiger Bestandteil der Signalkaskade zur Stimulation der Proteinsynthese ist (Métayer et al. 2008). Zusätzlich hat Methionin die Fähigkeit auf molekularer Ebene die Autophagozytose zu reduzieren (Sutter et al. 2013). Das ist damit zu begründen, dass der Methioninmetabolit SAM die Autophagozytose inhibiert (Sutter et al. 2013), Glutathion die zellulären ROS unschädlich macht (Liu et al. 2015) und die Genexpression von Atrogin- 1 bei höherer Methionin- Supplementation verringert ist (Del Vesco et al. 2015). Atrogin- 1 ist eine muskelspezifische Ubiquitin- Ligase, die das Schlüsselenzym für die Proteindegeneration mittels des Ubiquitin- Proteasomen- Systems ist (Li et al. 2004).

6.1.3 Einfluss auf das Gewicht der Gewebe

Wie zu erwarten, waren in der vorliegenden Studie die relativen Nieren- und Lebergewichte der geschlachteten Broiler nach allen drei Fütterungsphasen in den Gruppen mit Methioninzulage niedriger als in der Kontrollgruppe. Großteils waren diese Unterschiede auch signifikant. Beim Jejunumgewicht nach der Finisher- Phase zeigte sich der gleiche Effekt. Dies ist damit zu begründen, dass der höhere Gehalt an Methionin die Proteinbiosynthese in der Muskulatur förderte und die Organgewichte folglich relativ niedriger zum höheren Muskel- und somit auch Lebendgewicht der Tiere waren. Ein sehr deutlicher Effekt war nach der Finisher- Phase beim Nierengewicht zu beobachten. Das Nierengewicht in der Kontrollgruppe (suboptimale Methioninversorgung) war hier signifikant höher als in den Gruppen mit 0,1% Methioninzulage und die Gruppen mit 0,4% Methionin sowie die Gruppe DLM 0,25 (Methioninkonzentrationen über den Empfehlungen) wiesen wiederum signifikant niedrigere Werte auf als die Gruppe MHA 0,1.

Swennen et al. (2011) verglichen in ihrer Studie die Methioninquellen DLM und MHA mit einer Supplementierung von 0,25% Methionin in Broilerrationen mit unterschiedlichem Rohproteinanteil. Die genannten Autoren fanden heraus, dass das Lebergewicht nach 6 Wochen höher war, wenn auch der Rohproteinanteil in der Ration höher war. Außerdem führte die Supplementierung von MHA zu höheren Lebergewichten im Vergleich zu einer DLM- Zulage, unabhängig vom Rohproteinanteil.

Zhang et al. (2016) konnten in ihrer Studie nachweisen, dass bei einer Supplementation von 0,22% DLM bzw. MHA (auf equimolarer Basis) die relativen Nieren- und Lebergewichte nach Tag 21 bei Tieren mit DLM- Zulage niedriger und bei MHA- Zulage sogar signifikant niedriger waren im Vergleich zur Kontrollgruppe.

In der vorliegenden Studie gab es, im Gegensatz zu den Ergebnissen der genannten Autoren, keine unterschiedlichen Effekte zwischen den Methioninquellen.

Die niedrigeren Jejunumgewichte in den Gruppen mit Methionin- Supplementation, die in dieser Studie nachgewiesen wurden, lassen sich neben dem relativen Verhältnis zum Lebendgewicht vermutlich auch durch geringere Organaktivitäten bzw. weniger stark ausgebildetes immunologisches Gewebe im Darm erklären (Lillehoj & Trout 1996). Bauchart-Thevret et al. (2009) fanden im Gegensatz dazu heraus, dass die

enterale Fütterung einer Diät ohne jegliche schwefelhaltige Aminosäuren beim Schwein zu einem reduzierten Wachstum der Jejunummucosa führte. Dies war assoziiert mit einer Darmzottenatrophie und einer reduzierten epithelialen Zellproliferation.

Daraus lässt sich schließen, dass die Konzentration schwefelhaltiger Aminosäuren in der Kontrollgruppe der vorliegenden Studie ausreichte, um ein adäquates Wachstum der Jejunummucosa zu gewährleisten. Zudem führte die niedrigere GSH-Konzentration in der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Gruppen mit Methioninzulage zu einer höheren Konzentration an ROS im Darm und somit zu einem höheren Jejunumgewicht in Folge von stärker ausgebildetem immunologischem Gewebe.

Außerdem war in der vorliegenden Studie auch der Anteil an abdominalem Fettgewebe im Verhältnis zum Lebendgewicht in allen Gruppen mit Methioninzulage im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert. Signifikante Unterschiede gab es jedoch nur zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen MHA 0,1 und DLM 0,25. Diesen Effekt beschrieben auch Esteve- Garcia & Llauradó (1997). Die Studie der genannten Autoren zeigte außerdem, dass Broiler, die mit DLM gefüttert wurden, einen geringeren Anteil an abdominalem Fettgewebe besaßen als Broiler, deren Ration MHA zugesetzt wurde. Dieses Ergebnis ging mit einer höheren Futteraufnahme, der mit MHA gefütterten Tiere, einher, was wiederum zu einer höheren Lipogenese geführt haben könnte. Andererseits vermuteten Esteve- Garcia & Llauradó (1997), dass sich Methionin direkt negativ auf die Lipogenese auswirken könnte und die verminderte Futteraufnahme keine Ursache sondern eine Folge dessen war. Aufgrund des Mangels an schwefelhaltigen Aminosäuren (SAA) in der Kontrollgruppe konnten vermutlich weniger Proteine synthetisiert werden und die vorhandene Energie wurde in die Fettsynthese investiert. Dies wurde ebenfalls von Conde-Aguilera et al. (2014) in einer Studie mit Schweinen beschrieben. Dabei führte ein Mangel an SAA zu verminderten Proteingehalten in der Muskulatur, welches mit erhöhten Fetteinlagerungen einher ging.

Auf das Gewicht der Jejunummucosa und des abdominalen Fettgewebes wirkte sich eine suboptimale Methioninversorgung also negativ im Vergleich zu einer empfohlenen Methionin-Supplementierung aus, wohingegen eine Methioninzulage über den Bedarf hinaus zu keinen weiteren positiven Effekten führte.

6.2 Einfluss der verschiedenen Methioninquellen und -konzentrationen auf den antioxidativen Status der Broiler

Um den Einfluss der Behandlung auf den antioxidativen Status beim Broiler beurteilen zu können, wurden mittels labortechnischer Verfahren die Konzentrationen der Produkte des oxidativen Stresses (TBA-RS und PC) und von nicht-enzymatischen Antioxidantien (GSH und Tocopherol) sowie die Genexpression und Aktivität von antioxidativen Enzymen (SOD, GPx und CAT) bestimmt.

In Verbindung mit der GSH-Messung ist auch das oxidierte Glutathion (GSSG) und vor allem das GSH:GSSG-Verhältnis ein wichtiges Maß zur Beurteilung des antioxidativen Kapazität. GSH ist sehr reaktionsfreudig und kann daher Elektronen auf ROS übertragen und diese somit unschädlich machen. Bei dieser Reaktion entstehen aus zwei GSH-Molekülen das oxidierte GSSG. Je mehr ROS also durch GSH unschädlich gemacht werden desto mehr GSSG entsteht. In Folge dessen weist ein niedriges GSH:GSSG-Verhältnis auf oxidativen Stress hin (Marí et al. 2009). Aufgrund technischer Möglichkeiten sind die niedrigen GSSG-Konzentrationen in der vorliegenden Studie nicht messbar gewesen.

6.2.1 Oxidationsprodukte

Um den aktuellen antioxidativen Status der Broiler beurteilen zu können, wurden die Konzentrationen der TBA-RS und PC als Produkte der Lipidperoxidation und Proteinoxidation gemessen. Der Thiobarbitursäure (TBA)-Test ist ein Nachweis für sekundäre Abbauprodukte der Lipide, wie z.B. Malondialdehyde (MDA). Die TBA reagiert mit MDA zu einem farbigen Komplex, der photometrisch messbar ist (Ayala et al. 2014). Die Messung der PC erfolgte mittels eines Carbonyl-Assays. Das Assay misst Proteincarbonylgruppen, die als Produkt der Proteinoxidation entstehen, anhand der Reaktion mit DNPH (Celi & Gabai 2015). TBA-RS und PC wurden im Plasma und im Lebergewebe gemessen.

Ist der Körper in einem Zustand des oxidativen Stresses, werden Bestandteile des Organismus, unter anderem Lipide und Proteine, durch ROS oxidiert und somit geschädigt. Die Konzentrationen an TBA-RS und PC gelten als Marker für den oxidativen Stress und sollten in diesem Fall höher sein, als in Broilern, die keinem

oxidativem Stress ausgesetzt waren (Swennen et al. 2011; Höhn et al. 2013). Auch Del Vesco et al. (2014) beobachteten signifikant höhere TBA- RS- Konzentrationen bei Broilern mit akutem Hitzestress.

In der vorliegenden Studie ließen sich die Effekte, die sich aus unserer Hypothese ableiten, nur teilweise nachweisen. Laut unserer Hypothese sollten die Konzentrationen der Oxidationsprodukte in den Methionin-supplementierten Gruppen niedriger sein. Im Lebergewebe gab es jedoch nach keiner der drei Fütterungsphasen signifikante Unterschiede bezüglich der TBA- RS-Konzentration zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen mit Methioninzulage, wenn man die Methioninkonzentration betrachtete. Bezüglich der Methioninquelle zeigte sich jedoch nach der Starter- Phase, dass der Einsatz von DLM in der Fütterung zu höheren TBA- RS- Konzentrationen führte als die Fütterung mit MHA. Der gleiche Effekt war in der Studie von Swennen et al. (2011) im Plasma der Broiler nach 4 Wochen zu sehen. Die TBA- RS- Konzentration der Boiler, deren Ration mit MHA supplementiert wurde, war bei einer jeweiligen Methioninzulage von 0,25% signifikant niedriger, als bei Broilern mit einer DLM- Supplementierung.

Im Plasma zeigten sich ausschließlich nach der Starter- Phase signifikante Effekte der Methioninkonzentrationen. Die Konzentrationen an TBA- RS war in allen Methionin- supplementierten Gruppen niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine Methioninzulage über die Empfehlungen hinaus (0,25% und 0,4% Methioninzulage) wirkte sich dabei jedoch nicht signifikant besser aus als eine bedarfsgerechte Methionin- Supplementation von 0,1%. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Willemsen et al. (2011) überein, die nach 4 Wochen der Fütterung ebenfalls keine Unterschiede der TBA- RS- Konzentrationen zwischen den Methioninquellen MHA und DLM feststellen konnten.

Bezüglich der PC- Konzentrationen wies das Plasma nach der Finisher- Phase signifikant niedrigere Werte in den Gruppen mit Methioninzulage im Vergleich zur Kontrollgruppe auf, wenn man im Post- hoc- Test nur die Methioninkonzentration betrachtete. Im Lebergewebe war die PC- Konzentration der Gruppen mit einer Methioninzulage von 0,4% signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die PC- Konzentrationen der Gruppen mit 0,1% bzw. 0,25% Methionin lagen zwischen diesen Werten. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine geringfügig unter Bedarf gehaltene Methioninversorgung teilweise zu einer vermehrten und eine

Methioninversorgung über die Empfehlungen hinaus (0,4% Methioninzulage) zu einer verminderten Entstehung von PC im Vergleich zur bedarfsgerechten Methioninzulage von 0,1% führte. Der oxidative Schädigung von Proteinen konnte also durch eine Methionin- Supplementierung, die deutlich über den Empfehlungen lag, reduziert werden. Nach der Starter- und Grower- Phase waren keine Unterschiede hinsichtlich der Methioninkonzentration und der Methioninquelle festzustellen.

Shen et al. (2015) verglichen in ihrer Studie die Methioninquellen DLM und L- Methionin (0,285%) und fanden dabei heraus, dass der Einsatz von L- Methionin nach dem 21. Fütterungstag zu signifikant niedrigeren PC- Konzentrationen im Duodenum und in der Leber führte, als die Supplementierung mit DLM. Vergleichbare Resultate erhielten Shen et al. (2014) auch im Duodenum von Schweinen, deren Fütterungsration mit DLM bzw. L- Methionin supplementiert wurde. Diese Ergebnisse zeigten, dass L- Methionin den oxidativen Stress, vor allem in den Zellen der Darmmucosa, deutlich effizienter abwehren konnte im Vergleich zu DLM. Zudem gingen die niedrigeren PC- Konzentrationen mit stärker ausgeprägten Darmzotten einher.

Generell waren die Konzentrationen an TBA- RS und PC verhältnismäßig niedrig im Vergleich zu anderen Untersuchungen (Vossen et al. 2011 und Killi et al. 2015). Daraus kann man schließen, dass die Broiler keinen oder nur kaum oxidativen Stress hatten. Besonders deutlich wird dies, wenn man Studien betrachtet, bei denen oxidativer Stress induziert wurde. Willemsen et al. (2011) untersuchten beispielsweise die Auswirkungen von Hitzestress (32°C) beim Boiler im Vergleich zur Normaltemperatur (25-5-18°C) und verglichen dabei zusätzlich die Auswirkungen einer DLM- bzw- MHA- Supplementierung der Futtermittelration. Die genannten Autoren beschrieben, dass die Broiler, die Hitzestress ausgesetzt waren, deutlich höhere TBA- RS- Konzentrationen, niedrigere Werte der ferric reducing/antioxidative power (FRAP) im Plasma und signifikant niedrigere GSH- Konzentrationen sowie ein kleineres GSH:GSSG- Verhältnis im Lebergewebe aufwiesen. Diese Ergebnisse zeigten, dass der oxidative Stress durch höhere Temperaturen deutlich gesteigert wird. Außerdem resultierte aus dem besseren GSH:Gesamtglutathion- Verhältnis, dass MHA die Hitzestress- induzierten oxidativen Schäden effektiver verringern konnte als die Supplementierung von DLM.

In dem vorliegenden Versuch war der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Methionin-supplementierten Gruppen bezüglich des oxidativen Status der Broiler in den ersten drei Wochen vermutlich noch nicht so stark, dass dieser anhand der Proteinoxidation messbar gewesen wäre. Erst nach der Finisher- Phase kam es vermehrt zu oxidativem Stress und somit zur Proteinoxidation, die durch den Einsatz von Methionin vermindert wurde. Ein deutlicherer Effekt des Methionins auf die Konzentration der Oxidationsprodukte ließe sich also vermutlich durch induzierten oxidativen Stress hervorrufen.

Bezüglich der beiden Methioninquellen wiesen die mit MHA gefütterten Broiler im Plasma und im Lebergewebe tendenziell niedrigere PC- Konzentrationen auf als die Tiere, die mit DLM gefüttert wurden. Diese Ergebnisse stimmen neben den Ergebnissen von Willemsen et al. (2011) auch mit denen von Vázquez-Añ et al. (2006) überein. Die Studie dieser Autoren beschreibt, dass MHA und DLM unterschiedliche Dosis- Wirkungs- Formen haben. Unter adäquaten Konzentrationen an schwefelhaltigen Aminosäuren ist MHA effektiver, während DLM bei einem Defizit an schwefelhaltigen Aminosäuren MHA in seiner Effizienz übertrifft. Auch bei Swennen et al. (2011) wiesen die Broiler bei einem sehr hohen Proteingehalt in der Ration niedrigere TBA- RS- Konzentrationen im Plasma auf, wenn sie mit MHA gefüttert wurden. Das Plasma von DLM-gefütterten Broilern zeigte bessere antioxidative Eigenschaften (höhere FRAP), wenn man die Gruppen mit einem normalen Proteinlevel in der Ration fütterte. Der generell bessere antioxidative Status bei einer Fütterung mit einem sehr hohen Proteingehalt in der Ration ist zudem auf den dadurch entstehenden hohen Gehalt an Harnsäure zurückzuführen. Auch Harnsäure ist als wichtiges Antioxidans im Geflügel bekannt (Swennen et al. 2011).

6.2.2 Nicht-enzymatische Antioxidantien

Schwefelhaltige Verbindungen, wie Cystein, Glutathion (GSH) und Taurin, spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr des oxidativen Stresses, da sie in der Lage sind den zellulären Redox- Status zu beeinflussen. Cystein und GSH fungieren als Radikalfänger und können die oxidative Schädigung von z.B. Proteinen und Fetten reduzieren (Métayer et al. 2008). Bei einer ausreichenden Methionin- Supplementierung läuft der Stoffwechselweg der Transsulfonierung, im Vergleich zu einer limitierten Methionin- Versorgung, vermehrt ab. Dabei wird das

Methionin in Cystein umgewandelt und aus diesem wiederum GSH synthetisiert (Brosnan et al. 2007 und Ingenbleek & Kimura 2013). Die Methionin- Supplementierung ist somit wahrscheinlich verantwortlich für eine gesteigerte Konzentration des Antioxidans GSH. Die Transsulfonierung findet vor allem in Leber, Niere, Dünndarm und Pankreas statt. In diesen Organen ist, aufgrund der erhöhten Konzentration nicht- enzymatischer Antioxidantien, die Notwendigkeit von antioxidativen Enzymen für die Unschädlichmachung von ROS verringert (Brosnan & Brosnan 2006). In der Leber ist die GSH- Synthese und GSH- Konzentration im Vergleich zu allen anderen Geweben am höchsten. Abhängig ist die GSH- Synthese und -konzentration von der SAA- Verfügbarkeit, da GSH die Speicher- und Transportform von Cystein darstellt (Ingenbleek & Kimura 2013). Der Darm hat einen hohen Bedarf an SAA und enthält alle nötigen Enzyme für die Transmethylierung, Remethylierung und Transsulfonierung. Das ist die Voraussetzung dafür, dass ca. 23% des Methionins im Darm verstoffwechselt und z.B. für die Synthese cysteinhaltiger Mucine und Antioxidantien genutzt wird (Ingenbleek & Kimura 2013). Im Gastrointestinaltrakt findet ca. 25% der gesamten Transmethylierung und Transsulfonierung des Körpers statt (Bauchart-Thevret et al. 2009).

Die Hypothese, dass eine Methionin-Supplementierung des Futters die GSH- Produktion in der Leber steigern würde, wurde bestätigt. Zudem zeigte sich, dass die GSH- Konzentration in der Leber sogar dosisabhängig mit der steigenden Methioninkonzentration im Futter anstieg. Besonders nach der Grower- Phase war dieser Effekt deutlich zu erkennen. Die GSH- Konzentration der Kontrollgruppe war dabei signifikant niedriger als in der bedarfsgerecht gefütterten Gruppe (0,1% Methioninzulage) und eine Methionin- Supplementierung über die Empfehlungen hinaus (0,4% Methioninzulage) führten wiederum zu signifikant höheren GSH- Konzentrationen als die Zulage von 0,1% Methionin. Die gleichen Ergebnisse waren in etwas schwächerer Ausprägung auch nach der Starter- und Finisher- Phase zu sehen. Tendenziell waren auch die GSH- Gehalte im Plasma und in der Jejunummucosa in den Methionin-supplementierten Gruppen höher im Vergleich zur Kontrollgruppe, Signifikanzen ergaben sich in diesen Geweben jedoch nicht.

Prinzipiell stimmen diese Ergebnisse mit den Daten anderer Studien überein, die beschrieben, dass die Supplementierung einer Methioninquelle bei Broilern oder Schweinen zu einer erhöhten Konzentration an GSH und/ oder Taurin im Darm, in der

Leber und/ oder im Plasma führte, verglichen mit einer suboptimalen Methioninversorgung in der Ration (Shen et al. 2015, Shen et al. 2014 und Chen et al. 2014). Da GSH ein wichtiges Antioxidans ist (Métayer et al. 2008), kann man implizieren, dass die antioxidative Kapazität mit zunehmender GSH- Konzentration steigt. In der vorliegenden Studie wurde dies vor allem durch die signifikant niedrigeren PC- Konzentrationen den Gruppen mit Methioninzulage in der Leber nach der Finisher- Phase deutlich. Das supplementierte Methionin führte dementsprechend als Vorstufe des GSH dazu, dass die Empfindlichkeit der Broiler gegenüber oxidativem Stress teilweise vermindert wurde. Im Gegensatz zu den PC wurde die Konzentration der TBA- RS jedoch nicht positiv beeinflusst.

Von Del Vesco et al. (2014) wurde festgestellt, dass unter Hitzestress, also einem Zustand, bei dem oxidativer Stress induziert wurde, die GSH- Konzentrationen in der Leber bei Broilern mit Methionin- Supplementation höher waren als bei Broilern mit einer methioninarmen Fütterung. Unter Bedingungen des Hitzestresses wirkte sich der Einsatz von MHA positiver auf die antioxidative Kapazität der nicht- enzymatische Abwehr aus als DLM. Vor allem höhere GSH:GSSG- Verhältnisse in der Leber bei Broilern, die Hitzestress ausgesetzt waren und mit MHA gefüttert wurden, weisen darauf hin (Willemssen et al. 2011). Der Grund dafür ist, dass MHA effektiver zu Cystein umgewandelt werden kann als DLM und Cystein wiederum eine Vorstufe von Taurin und GSH ist (Swennen et al. 2011). Dies zeigte eine Studie von Martín-Venegas et al. (2006), bei der Darmabschnitten mit DLM bzw. MHA inkubiert wurden. Außerdem war ein Anstieg anderer Metaboliten der Transsulfonierung zu beobachten. Die Taurin- Konzentration im Plasma war bei Schweinen und Geflügel höher, wenn MHA anstatt DLM gefüttert wurde (Fang et al. 2010).

Ebenso zeigten die Ergebnisse von Swennen et al. (2011), dass es bei Rationen mit 18,3% oder 23,2% Rohprotein Unterschiede zwischen einer MHA- und einer DLM- Zulage gab. Während die Supplementation mit MHA bei einer Fütterung mit einem niedrigen Rohproteinanteil zu höheren GSH- Konzentrationen im Vergleich zu DLM führte, resultierte aus einer Supplementierung mit DLM bei hohem Rohproteinanteil eine bessere antioxidative Kapazität.

Diese unterschiedlichen Effekte zwischen DLM und MHA bezüglich des oxidativen Status sind bislang jedoch nur in einem Stresszustand nachgewiesen. Unter normalen Temperaturbedingungen (25,5°C) und gleichem Rohproteinanteil gibt es keine

Unterschiede der GSH- Konzentrationen zwischen den beiden Methioninquellen DLM und MHA (Willemsen et al. 2011, Swennen et al. 2011 und Del Vesco et al. 2014). Diese Aussage stimmt auch mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie überein. Basierend auf den Arbeiten der genannten Autoren, kann man also davon ausgehen, dass die beiden Methioninquellen das antioxidative Abwehrsystem in unterschiedlicher Art und Weise beeinflussen haben. Die vermutlich bestehenden Effekte waren jedoch wahrscheinlich zu gering, um sie *in vivo* und in gesunden Tieren mit dem vorliegenden Versuchsaufbau und den von uns verwendeten Analyseverfahren nachzuweisen.

Neben GSH ist auch Vitamin E und insbesondere seine biologisch aktivste Form α -Tocopherol ein wichtiges nicht-enzymatisches Antioxidans (Sies 1997). Die Supplementierung der Broiler- Ration mit Vitamin E führte zu einem erhöhten α -Tocopherol- Gehalt und steigerte somit die antioxidative Kapazität in Geweben (Husvéth et al. 2000). Die Tocopherol- Konzentration in der Leber, im Jejunum und im Plasma war in der vorliegenden Studie nach fast allen Fütterungsphasen bei den Broilern mit Methioninzulage höher als bei jenen in der Kontrollgruppe. Außerdem war vor allem im Lebergewebe zu sehen, dass eine suboptimale Versorgung mit Methionin (Kontrollgruppe) zu geringeren Tocopherol- Konzentrationen im Vergleich zu einer empfohlenen Zulage von 0,1% Methionin führte. Eine Methionin- Supplementierung über die Empfehlungen hinaus steigerte die Tocopherol- Konzentration zudem weiter.

Dass sowohl die GSH- als auch die Tocopherol- Konzentrationen in der vorliegenden Studie in den Gruppen mit Methioninzulage höher waren im Vergleich zur Kontrollgruppe, ist durch die Regenerationsfähigkeit des oxidierten Vitamin E zu begründen. Bei der Unschädlichmachung von ROS wird Tocopherol zu einem Tocopherol-Radikal oxidiert, welches durch Vitamin C und GSH wieder regeneriert werden kann (Freisleben & Packer 1993). Die höheren GSH- Gehalte in den Gruppen mit Methioninzulage, die aus der höheren Methioninverfügbarkeit resultierten, konnten folglich zu höheren Tocopherol- Konzentrationen führen, da das oxidierte Tocopherol mit Hilfe von GSH recycelt wurde (Husvéth et al. 2000).

Außerdem kann man annehmen, dass der Anstieg der Tocopherol-Konzentrationen dadurch zustande kam, dass Tocopherol als Antioxidant weniger verbraucht wurde. Da die Verfügbarkeit an GSH in den Methionin-supplementierten Gruppen deutlich höher war und beide Antioxidantien als Fänger freier Radikale fungierten, wurde das Tocopherol weniger benötigt (Blokchina et al. 2003).

6.2.3 Antioxidative Enzyme

Die antioxidative Abwehr beinhaltet mehrere Strategien und neben den nicht-enzymatischen Antioxidantien gehören auch die antioxidativen Enzyme dazu. Die drei wichtigsten Enzyme sind die SOD, die GPx und die CAT (Sies 1997). Sowohl die Genexpression als auch die Enzymaktivität dieser Enzyme wurde bestimmt, um Aussagen über die antioxidative Kapazität treffen zu können. Oxidativer Stress ist zu Beginn mit einem Anstieg der Aktivität antioxidativer Enzyme verbunden, um die Zellen kurzfristig vor ROS zu schützen. Wenn die Tiere über einen längeren Zeitraum oder besonders starkem oxidativen Stress, wie z.B. Hitzestress, ausgesetzt sind, kann die Aktivität der Enzyme sinken. Das hängt mit der fortschreitenden Schädigung von Zellen und der damit verbundenen Exkretion von Mineralien, wie Kupfer, Zink und Selen, die als Cofaktor für antioxidative Enzyme fungieren, zusammen (Akbarian et al. 2014). Zum anderen können die adaptiven Mechanismen der SOD aber auch mit einem zu hohen Stresslevel überfordert sein (Surai 2015).

Laut unserer Hypothese sollte die mRNA-Konzentration und die Aktivität der antioxidativen Enzyme bei den Broilern deren Futter mit Methionin supplementiert wurde niedriger sein als in der Kontrollgruppe. Andere Studien zeigten bereits, dass ein Anstieg von ROS die Steigerung der enzymatischen Aktivität zur Folge hat (Tan et al. 2010). Der Grund dafür ist, dass ROS Transkriptionsfaktoren wie z.B. *Nrf2* aktivieren, die für die Transkription der antioxidativen Enzyme verantwortlich sind (Gorrini et al. 2013 und Kaspar et al. 2009). Diese Vermutung stimmte mit den Ergebnissen dieser Studie nur teilweise überein.

Im Leber- und Nierengewebe konnten in der vorliegenden Studie nur vereinzelt methioninabhängige Effekte bezüglich der relativen mRNA-Konzentration und der Enzymaktivitäten von SOD, GPx und CAT festgestellt werden. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die ROS bei einer ausreichenden Methionin-Versorgung bereits durch nicht-enzymatische Antioxidantien wie GSH unschädlich gemacht wurden und dem oxidativen Stress weniger durch die Aktivität antioxidativer Enzyme entgegengewirkt werden musste. Durch die niedrigere ROS-Konzentration in den Broilern mit Methionin-supplementiertem Futter wurden folglich Transkriptionsfaktoren des antioxidativen Systems weniger aktiviert und antioxidative Enzyme weniger exprimiert.

Im Gegensatz zum Leber- und Nierengewebe gab es in der Jejunummucosa deutlichere Effekte der Methioninkonzentration auf die antioxidativen Enzyme. In den Gruppen mit Methioninzulage zeigten sich signifikant niedrigere mRNA- Konzentrationen sowie Enzymaktivitäten der SOD, GPx und CAT in manchen Fütterungsphasen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusätzlich führte eine Methioninzulage über die Empfehlungen hinaus teilweise zu niedrigeren mRNA- Konzentrationen und Enzymaktivitäten im Vergleich zu einer Methioninsupplementierung von 0,1%. Dies wurde vor allem bei der Genexpression der CAT nach der Starter- Phase und der GPx2 sowie GPx7 nach der Finisher- Phase deutlich. Auch die Enzymaktivitäten der CAT nach der Starter- und Finisher- Phase waren in der Jejunummucosa mit einer Methioninzulage über dem empfohlenen Bedarf geringer, als in den Gruppen mit 0,1% Methionin.

Aus einer suboptimale Methioninversorgung resultierte also offensichtlich ein Anstieg der enzymatischen Abwehr im Darm. Man kann also annehmen, dass die suboptimale Methioninversorgung in der Kontrollgruppe zu einer ungenügenden Eliminierung von ROS durch nicht- enzymatische Antioxidantien führte. Die vorhandenen ROS wiederum aktivierten die Transkriptionsfaktoren des antioxidativen Abwehrsystems im Darm und folglich wurden antioxidative Enzyme exprimiert. In den Gruppen mit Methioninzulage war die Konzentration an nicht- enzymatischen Antioxidantien im Darm vermutlich hoch genug (GSH geringfügig und Tocopherol signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe), um den oxidativen Stress, auch ohne einen Anstieg der Enzymaktivität, kompensieren zu können.

Die Unterschiede in der Enzymaktivität zwischen der Jejunummucosa und dem Leber- und Nierengewebe ist vermutlich auf die höhere GSH- Synthese- Aktivität in Leber und Niere zurückzuführen. Da die Leber die primäre Lokalisation der GSH-Produktion ist (Wu et al. 2004), hatten dort wahrscheinlich schon die Tiere der Kontrollgruppe genügend GSH zur Verfügung, um den antioxidativen Stress alleine durch nicht- enzymatische Antioxidantien zu kompensieren. Da die GSH- Konzentration in der Jejunummucosa in der Kontrollgruppe nicht hoch genug war, wurden dort die Enzyme für die antioxidative Abwehr benötigt.

Wie auch schon in 6.2.1 und 6.2.2 erwähnt, sind die fehlenden Effekte in Niere und Leber vermutlich darauf zurückzuführen, dass diese Studie mit gesunden Tieren und unter normalen Bedingungen durchgeführt wurde. In Folge dessen gab es auch keine

Unterschiede bezüglich der antioxidativen Enzyme zwischen den Methioninquellen DLM und MHA. Diese Ergebnisse stimmten mit der Studie von Willemsen et al. (2011) überein. Die Daten dieser Autoren zeigten, dass die Stoffwechselwege, die vom oxidativen Stress induziert wurden, sowohl bei den Tieren mit Methioninzulage als auch bei den Tieren in der Kontrollgruppe nicht bzw. gleichermaßen aktiviert waren. Die Unterschiede bezüglich des oxidativen Status waren vermutlich in Leber und Niere zu gering, um sie *in vivo* nachweisen zu können. Auch die absoluten Werte der Enzymaktivität waren in dieser Studie teilweise niedriger als in anderen Studien. Beispielsweise war die Aktivität der SOD, CAT und GPx in Leber und Niere bei Akbarian et al. (2014) und die Aktivität der Leber- SOD bei Ramnath et al. (2008) deutlich höher. In beiden Studien wurde allerdings oxidativer Stress induziert. ROS stimulieren die Zelle und ändern durch Oxidation die dreidimensionale Struktur des Keap1. Dieser gibt dadurch das Nrf2- Molekül frei, welches in den Zellkern wandert, dort an das ARE bindet und die Transkription der Zielgene (antioxidative Enzyme) veranlasst (Tkachev et al. 2011, Baird & Dinkova-Kostova 2011) (siehe 2.1.3). Die hohen Enzymaktivitäten sind also durch die akute enzymatische Abwehr der ROS zu begründen.

Del Vesco et al. (2014) verglichen in ihrer Studie die Auswirkungen von Hitzestress auf das Redoxsystem bei Broilern die mit einer Methionin-supplementierten Ration gefüttert wurden im Vergleich zu Broilern deren Futterration einen Mangel an Methionin aufwies. Es zeigte sich, dass die Aktivität der GPx, welche GSH nach der Unschädlichmachung von z.B. H_2O_2 wieder regenerieren kann, bei Broilern, die Hitzestress ausgesetzt waren und deren Futterrationen mit Methionin supplementiert wurden, am höchsten war. Durch die Supplementierung von Methionin konnte ausreichend GSH synthetisiert werden, welches unter Stressbedingungen durch entsprechend hohe GPx- Aktivitäten regeneriert wurde. In der gleichen Studie war die CAT- Aktivität bei den Broilern mit einer suboptimalen Methioninversorgung höher. CAT kann H_2O_2 in Sauerstoff und Wasser umsetzen und ist daher ein entscheidender Bestandteil der Unschädlichmachung von H_2O_2 . Die höhere CAT- Aktivität könnte auf einen zellulären Kompensationsmechanismus zurückzuführen sein. Da andere Abwehrmechanismen, wie z.B. die GPx- Aktivität und die GSH- Konzentration, bei Broilern, die mit einer suboptimalen Methioninkonzentration versorgt wurden, verringert waren, stieg die Notwendigkeit der enzymatischen Abwehr mittels CAT an (Del Vesco et al. 2014).

Diskussion

In der Studie von Castellano et al. (2015) wurden Auswirkungen unterschiedlicher Methioninkonzentrationen in der Fütterungsration von Schweinen auf den Lipidmetabolismus und antioxidative Stoffwechselwege untersucht. Dabei wurde ein Methioninmangel in der Ration mit einer adäquaten Methioninzulage über einen Zeitraum von 10 Tagen verglichen. Es zeigte sich, dass die antioxidativen Enzyme SOD und CAT im Fettgewebe und in den Muskeln der Schweine mit einer suboptimalen Methioninversorgung signifikant höhere Aktivitäten aufwiesen als bei Schweinen mit einer adäquaten Methioninzulage. Außerdem wirkte sich eine reduzierte Methioninfütterung in erhöhten Lipidgehalten im subkutanen Fettgewebe aus. Durch den Mangel in SAA konnten weniger Proteine synthetisiert werden und somit wurde die vorhandene Energie in Form von vermehrter Fetteinlagerung gespeichert (Conde-Aguilera et al. 2014).

7 Fazit

Die vorliegende Studie sollte Erkenntnisse über die Auswirkung einer Methionin-Supplementierung in verschiedenen Zulagestufen, durch die beiden Methioninquellen DLM und MHA, auf die Leistung und vor allem die antioxidative Kapazität beim Broiler liefern. Dabei wurde, neben dem Vergleich der beiden Methioninquellen, besonders die Wirkung einer suboptimalen Methioninversorgung (Kontrollgruppe, ca. 15% unter den Empfehlungen der NRC) im Vergleich zur einer bedarfsgerechten Methioninzulage (0,1%) betrachtet. Zusätzlich wurde die Wirkung einer Methioninfütterung über den Bedarf hinaus (0,25% und 0,4%) untersucht. Als zu untersuchende Parameter wurden dabei die Leistungsdaten, die Schlachtkörperdaten, die Oxidationsprodukte sowie nicht-enzymatische Antioxidantien und antioxidative Enzyme verwendet.

Es zeigte sich, dass eine suboptimale Methioninversorgung in allen Fütterungsphasen zu signifikant schlechteren Leistungsdaten führte im Vergleich zu einer bedarfsgerechten Methioninzulage. Zusätzlich wirkte sich eine Methionin-Supplementierung über die Empfehlungen hinaus (0,4%) nach der Finisher- Phase positiv auf die Endkörpergewichte und Gewichtszunahmen im Vergleich zur Gruppe mit 0,1% Methionin aus. Ebenso wiesen die Schlachtkörperdaten größtenteils bessere Werte auf, wenn Methionin in empfohlener Menge zugesetzt wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Methioninzulage über den Bedarf hinaus führte dabei nach der Finisher- Phase beim Brustmuskelgewicht und Gewicht des Nierengewebes sogar zu signifikant besseren Ergebnissen als die Supplementierung mit 0,1% Methionin.

Im Lebergewebe war die Konzentrationen der nicht- enzymatischen Antioxidantien GSH und Tocopherol nach allen Fütterungsphasen höher, wenn Methionin bedarfsgerecht supplementiert wurde im Vergleich zu einer suboptimalen Versorgung. Zusätzlich wirkte sich eine Methioninzulage über den empfohlenen Bedarf hinaus hierbei positiv auf die GSH- und Tocopherol- Konzentrationen aus. Der gleiche Effekt zeigte sich auch bezüglich der Tocopherol-Konzentration im Plasma nach der Finisher- Phase. Die TBA-RS nach der Starter-Phase sowie die PC nach der Finisher- Phase wiesen im Plasma in allen Methionin-supplementierten Gruppen geringere Konzentrationen auf als in der Kontrollgruppe. Im Lebergewebe war nur

Fazit

nach der Finisher-Phase ein Effekt der PC zu sehen. Die PC-Konzentration nahm dabei mit steigender Methioninzulage ab.

Die Genexpressionen und Aktivitäten der antioxidativen Enzyme SOD, GPx und CAT wurden nur teilweise durch die Methioninkonzentration in der Ration beeinflusst. Effekte bei der Genexpression waren lediglich in der Jejunummucosa zu sehen. Die Kontrollgruppe wies hier deutlich höhere mRNA-Konzentrationen der SOD (nach Tag 10 und Tag 21), CAT (nach Tag 10) und GPx (nach Tag 35) auf als in den Gruppen mit Methioninzulage. Zusätzlich waren bei der CAT nach der Starter-Phase und bei GPx nach der Finisher-Phase tendenziell niedrigere mRNA-Konzentrationen zu beobachten, wenn Methionin über die Empfehlungen hinaus (25% und 0,4%) gefüttert wurde im Vergleich zur bedarfsgerechten Fütterung von 0,1%. Effekte der Enzymaktivität zeigten sich bei der CAT im Nierengewebe nach Tag 10 und in der Jejunummucosa nach Tag 10 und Tag 35 sowie bei der GPx in der Jejunummucosa nach Tag 10 und Tag 21. Die Enzymaktivität war größten Teils in der Kontrollgruppe signifikant höher als in den Gruppen mit 0,1% Methionin und teilweise wiesen die Gruppen mit einer Methioninzulage über dem empfohlenen Bedarf (0,25% und 0,4%) zudem niedrigere Aktivitäten auf im Vergleich zu der bedarfsgerechten Supplementierung von 0,1% Methionin.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich eine Supplementierung der Fütterungsrationen mit Methionin nach den Empfehlungen der NRC (1994) im Vergleich zu einer suboptimalen Methioninversorgung (Kontrollgruppe) positiv auf die Leistung und die antioxidative Kapazität der Broiler auswirkte. Zudem konnte durch eine Methioninzulage über die Empfehlungen hinaus (0,25% und 0,4%) in vielen Fällen eine zusätzliche Steigerung der Leistung bzw. Verbesserung der antioxidativen Aktivität erzielt werden. Hinweise darauf gaben die höheren Konzentrationen an nicht-enzymatischen Antioxidantien, die verringerte Aktivität antioxidativer Enzyme im Darm und eine niedrigere Konzentration an oxidativen Produkten im Plasma und im Lebergewebe

Die Konzentrationen an nicht-enzymatischen Antioxidantien (GSH und Tocopherol) in der Leber reichten in allen Versuchsgruppen der vorliegenden Studie aus, um freie Radikale abzufangen und die Oxidation von Fetten und Proteinen zu verhindern. Außerdem waren genügend nicht-enzymatische Antioxidantien vorhanden, dass es nicht nötig war, das enzymatische antioxidative System zu aktivieren. Ebenso wiesen

Fazit

insbesondere die hohen Tocopherol- Konzentrationen im Plasma und in der Jejunummucosa darauf hin, dass auch dort die nicht- enzymatische Abwehr aktiv war. Die geringeren Konzentrationen an TBA-RS und PC gaben einen Hinweis darauf, dass die oxidative Schädigung von Fetten und Proteinen im Plasma erwartungsgemäß durch die Methioninzulage reduziert werden konnte. Auch in der Leber konnten vor allem nach der Finisher- Phase positive Effekte bezüglich des oxidativen Status durch eine Methionin- Supplementation festgestellt werden.

Auf die Aktivität der antioxidativen Enzyme hatte die Supplementierung mit Methionin in dieser Studie nur einen geringen Einfluss. Da im Nieren- und Lebergewebe kein Anstieg der Enzymaktivität in den Methionin- supplementierten Gruppen festzustellen war, ist davon auszugehen, dass der oxidative Stress in diesem Versuch relativ gering war. Somit konnte dieser alleine durch das nicht- enzymatische Abwehrsystem der Broiler, deren Futter mit DLM oder MHA supplementiert wurde, kompensiert werden. Im Gegensatz dazu war die GSH- Konzentration der Kontrollgruppe in der Jejunummucosa nicht hoch genug und die Abwehr der ROS musste durch einen Anstieg der antioxidativen Enzyme unterstützt werden.

Hinsichtlich der Methioninquelle war die Leistung und die oxidative Kapazität der Broiler nahezu identisch. Nur in vereinzelten Fällen waren Unterschiede zwischen den beiden Methioninquellen zu beobachten. Beim Brustmuskeltgewicht, Gewicht des Nierengewebes und der Tocopherol- Konzentration im Plasma nach der Finisher Phase sowie der TBA-RS-Konzentration in der Leber nach der Starter- Phase führte die Fütterung von DLM zu besseren Ergebnissen, wohingegen sich die Zulage von MHA die Tocopherol-Konzentration im Jejunum und die GPx-Expression in der Leber nach der Starter-Phase positiver auswirkte. Diese Ergebnisse implizieren, dass das antioxidative Abwehrsystem gesunder Broiler nicht positiver beeinflusst wurde, wenn MHA anstatt DLM supplementiert wurde. Um genauere Erkenntnisse bezüglich der Bioeffizienz beider Methioninquellen und deren Auswirkungen auf das antioxidative System zu erlangen, bedarf es weiterer Studien und Untersuchungen. Wie im Vorangegangenen schon erwähnt, könnte man oxidativen Stress, z.B. durch Hitzestress, künstlich induzieren, um potentielle Unterschiede der Methioninquellen DLM und MHA auf das antioxidative System deutlicher sichtbar zu machen.

8 Zusammenfassung

Methionin ist die erstlimitierende Aminosäure beim Geflügel und somit essenziell für verschiedenste Funktionen im Organismus. In der kommerziellen Broilermast ist dieser Aspekt sehr wichtig, da durch eine optimale Methioninzufuhr über das Futter die Leistung der Tiere gesteigert werden kann. In der Praxis werden die beiden Methioninprodukte DL- Methionin (DLM) oder das DL-2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid (DL-HMTBA; MHA) für die Supplementierung des Futters mit Methionin genutzt. DLM ist ein kristallines Pulver, welches mehr als 99% DL- Methionin enthält. MHA hingegen ist ein flüssiges Produkt, das eine Reinheit von lediglich 88% besitzt. Beide Methioninquellen wurden in den letzten Jahrzehnten in zahlreichen Studien verglichen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Hypothese zu untersuchen, dass sich eine Methionin-Supplementation positiv auf den antioxidativen Status in Plasma und Geweben beim Broiler auswirkt. Methionin übernimmt zahlreiche wichtige Funktionen im Organismus und kann als Vorstufe des Antioxidans Glutathion für die antioxidative Kapazität von Bedeutung sein. Aufgrund dessen sollte untersucht werden, wie sich eine suboptimale Methioninversorgung (Kontrollgruppe) bzw. eine Methioninzulage über den Bedarf hinaus (0,25% und 0,4%) im Vergleich zu einer bedarfsgerechten Methioninversorgung (0,1%), die als Kontrolle angesehen wurde, auf den antioxidativen Status der Broiler auswirkt. Außerdem wurden die beiden Methioninquellen DLM und MHA in der vorliegenden Studie, hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Leistung und die antioxidative Kapazität der Broiler, verglichen.

Dafür wurden in diesem Versuch 336 männliche Eintagsküken der Zuchtlinie Cobb500 in sieben Versuchsgruppen unterteilt. Durch eine Phasen- Fütterung mit drei unterschiedlichen, auf Weizen und Sojamehl basierenden, Basisrationen während der Tage 1-10, 11-21 und 22-35 wurde der Erhaltungs- und Wachstumsbedarf gedeckt. Lediglich der Gehalt an Methionin lag ungefähr 15% unter den Empfehlungen der NRC. Die Basisrationen wurden jeweils mit 0,1, 0,25 oder 0,4% Methionin in Form von DLM oder MHA supplementiert (äquimolar vergleichbar). Die Körpergewichte und die Futteraufnahme wurden aufgezeichnet und an Tag 10, 21 und 35 wurden Tiere jeder Versuchsgruppe geschlachtet, um Proben von Plasma, Leber, Niere und Jejunummucosa zu entnehmen. Die Wachstumsleistung und die

Zusammenfassung

Schlachtkörpergewichte waren geringer, wenn die Methioninkonzentration im Futter unter den Empfehlungen der NRC war (Kontrollgruppe) und stiegen mit Erhöhung der Methioninkonzentration (Gruppen mit Methioninzulage). Der antioxidative Status wurde durch die Methionin-Supplementierung in Relation zur unsupplementierten Kontrolle in den meisten Geweben in allen drei Fütterungsphasen positiv beeinflusst. Die Parameter des antioxidativen Status, deren Werte signifikante Unterschiede aufwiesen, variierten dabei je nach Gewebe und Fütterungsphase. Zusätzlich wirkte sich eine Methioninzulage über den empfohlenen Bedarf hinaus bei einigen Parametern positiv im Vergleich zur bedarfsgerechten Gruppe mit 0,1% Methionin aus. Die Methioninquelle (DLM oder MHA) hatte dabei großteils keinen Einfluss.

Die Glutathionkonzentrationen (GSH) in der Leber war nach allen Fütterungsphasen in der Kontrollgruppe niedriger als in den Gruppen mit Methioninzulage. Die Tocopherolgehalte in Plasma, Leber und Jejunum waren im Vergleich zur Kontrollgruppe nach allen Fütterungsphasen, mit Ausnahme von Plasma Starter und Jejunum Grower, höher, wenn eine Methioninzulage vorgenommen wurde. In der Jejunummucosa waren die relativen mRNA-Konzentrationen der CAT und der SOD nach Tag 10, der SOD nach Tag 21 und der GPx nach Tag 35 sowie die Aktivitäten der SOD und CAT nach der Grower-Phase in der Kontrollgruppe höher als in den Behandlungsgruppen mit Methionin. Im Leber- und Nierengewebe gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den sieben Versuchsgruppen bezüglich der antioxidativen Enzyme. Die Oxidationsprodukte TBA- RS und PC im Plasma waren im Vergleich zur Kontrollgruppe nach der Starter- und nach der Finisher-Phase in den Broilern niedriger konzentriert, deren Ration mit Methionin supplementiert wurde. Im Lebergewebe zeigte sich der gleiche Effekt nur bezogen auf die PC nach der Finisher- Phase.

Zusammenfassend zeigten die Daten der vorliegenden Arbeit, dass die bedarfsgerechte Methionin- Supplementation des Futters gesunder Broiler, im Vergleich zu der Methioninzulage unter Bedarf in der Kontrollgruppe, zu einem Konzentrationsanstieg der Antioxidantien im Plasma und Geweben führte und diese teilweise sogar zusätzlich gesteigert wurden, wenn die Methioninzulage über die Empfehlungen hinaus ging. Außerdem ließen die verringerten mRNA- Konzentrationen der Enzyme und Enzymaktivitäten darauf schließen, dass der oxidative Stress in der Jejunummucosa durch die Methioninzulage reduziert wurde.

Zusammenfassung

Unterschiede zwischen den beiden Methioninquellen gab es dabei nicht. Die vermehrte Eliminierung von ROS durch nicht-enzymatische Antioxidantien, deren Konzentrationen durch die Methionin-Supplementierung gesteigert wurden, resultierte vermutlich in verminderter Synthese und höheren Aktivitäten von SOD, CAT und GPx. Der Grund dafür ist, dass ROS Transkriptionsfaktoren aktivieren, die für die Transkription der antioxidativen Enzyme verantwortlich sind.

9 Summary

Methionine is the first limiting amino acid in poultry and is essential in a huge number of metabolic functions. This aspect is very important in the commercial production of broiler chickens because the optimal dietary supply with methionine increases the broilers' performance and is therefore more economic. The Broiler diets are commonly supplemented with the two methionine sources DL- methionine (DLM) or DL-2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid (DL-HMTBA; MHA). DLM is a crystalline powder containing more than 99% DL- methionine whereas MHA is a liquid product with 88% of active substance. In recent decades, the investigation and comparison of these two methionine sources have been subject of many studies.

This study hypothesized that dietary supplementation of methionine positively affects plasma and tissue antioxidant status of broilers. Methionine has plenty of functions in the organism, especially as precursor of the antioxidant glutathione, which can be important for the antioxidative capacity. Thus, it was investigated in which way a suboptimal methionine supplement (control) or a supplement higher than the recommended level (0,25% and 0,4%) would influence the antioxidative status in comparison to 0,1% methionine supplementation, which was regarded as the control level. Furthermore, the effect of the methionine sources DLM and MHA on the antioxidative status were supposed to be compared.

336 day-old male Cobb500 broilers were allotted to seven experimental groups and were phase-fed with three differently composed basic diets, which were based on wheat and soybean flour, during days 1-10, 11-21 and 22-35 to meet their requirements for maintenance and growth except for methionine and cysteine which were approximately 15% below NRC recommendations. The basic diets were supplemented with 0,1, 0,25 or 0,40% of methionine either as DLM or MHA (equimolar comparison). Body weight and feed consumption were determined and each 6 birds per group were slaughtered at days 10, 21 and 35 to collect samples of plasma, liver and jejunum mucosa. Growth performance and carcass weights increased with increasing dietary methionine concentration. The antioxidant status was positively influenced by methionine supplementation in most tissues and all age groups of birds with addition of either methionine source. The parameters of the antioxidative status,

Summary

which showed significant differences, varied in tissue and bird ages. In addition, the methionine supplement higher than the recommended level was more effective in some parameters of the antioxidative status than in groups with 0,1% methionine supplementation.

The concentrations of glutathione (GSH) in the liver of control birds were lower than in birds fed with methionine-supplemented diets in all ages. In jejunum, liver and plasma, tocopherol concentrations were higher in birds fed with methionine-supplemented diets compared to the control birds, except for plasma starters and jejunum grower. In jejunum mucosa relative mRNA abundances of CAT and SOD after day 10, of SOD after day 21 and of GPx after day 35 as well as activities of SOD and CAT after grower period decreased in birds fed with methionine-supplemented diets compared to the control birds. In liver and kidney, there were no significant differences between the seven experimental groups in investigated antioxidative enzymes. Plasma concentrations of thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) and protein carbonyls (PC) were lower in 10-day and 35-day old birds fed with methionine-supplemented diets in comparison to the control birds. The same effect was shown for PC in the liver of 35-day old birds.

In summary, these data indicate that dietary methionine supplementation in healthy broilers results in an increased antioxidant status in plasma and body tissues. The antioxidative status was partially even more increased when methionine supplementation was higher than the recommended level. In addition, methionine reduced oxidative stress in the jejunum mucosa as evidenced by reduced mRNA abundance and activities of antioxidant enzymes with no difference between methionine sources. The increased elimination of ROS by non-enzymatic antioxidants, which concentrations were increased by methionine-supplementation, probably resulted in a decreased syntheses and higher activities of SOD, CAT and GPx. ROS can activate transcription factors, which are responsible for transcription of antioxidative enzymes.

10 Literaturverzeichnis

- Acar, N., Barbato, G.F. & Patterson, P.H., 2001. 2. the Effect of Feeding Excess Methionine on Live Performance, Carcass Traits, and Ascitic Mortality. *Poultry science*, 80(11), pp.1585–1589.
- Aebi, H., 1983. Catalase. In *Methods of Enzymatic Analysis*. pp. 273–277.
- Akbarian, A. et al., 2014. Gene expression of heat shock protein 70 and antioxidant enzymes, oxidative status, and meat oxidative stability of cyclically heat-challenged finishing broilers fed *Origanum compactum* and *Curcuma xanthorrhiza* essential oils. *Poultry science*, 93(8), pp.1930–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24931966>.
- Anderson, M.E., 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions*, 111(112), pp.1–14.
- Apel, K. & Hirt, H., 2004. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol*, 55, pp.373–99.
- Ayala, A., Munoz, M.F. & Argüelles, S., 2014. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, pp.1–31.
- Azzi, A., 2007. Molecular mechanism of α -tocopherol action. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), pp.16–21.
- Baird, L. & Dinkova-Kostova, A.T., 2011. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Archives of Toxicology*, 85, pp.241–272.
- Baker, D.H. & Boebel, A.P., 1980. Utilization of the D-and L-Isomers of Methionine and Methionine Hydroxy Analogue as Determined by Chick Bioassay. *The Journal of Nutrition*, 110, pp.959–964.
- Balnave, D. & Brake, J., 2004. Evidence Supporting the Hypothesis that Ambient Temperature and Dietary Composition Influence the Relative Efficacy of Methionine and Its Hydroxy Analogues for Broilers: A Review DESCRIPTION OF PROBLEM. *J. Appl. Poult. Res*, 13, pp.693–700.
- Balz, M.K., Schulte, E. & Thier, H.-P., 1993. Simultaneous Determination of α -

- Tocopheryl Acetate, Tocopherols and Tocotrienols by HPLC with Fluorescence Detection in Foods. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 95(6), pp.215–220.
- Barnes, D.M., Calvert, C.C. & Klasing, K.C., 1995. Methionine Deficiency Decreases Protein Accretion and Synthesis but Not tRNA Acylation in Muscles of Chicks¹². *American Institute of Nutrition*, 95, pp.2623–2630.
- Bauchart-Thevret, C. et al., 2009. Sulfur amino acid deficiency upregulates intestinal methionine cycle activity and suppresses epithelial growth in neonatal pigs. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 296(6), pp.E1239–E1250. Available at: <http://ajpendo.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpendo.91021.2008>.
- Bauchart-Thevret, C., Stoll, B. & Burrin, D.G., 2009. Intestinal metabolism of sulfur amino acids Nutrition Research Reviews. *Nutrition Research Reviews*, 22, pp.175–187.
- Berlett, B.S. & Stadtman, E.R., 1997. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress*. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, pp.20313–20316.
- Bieri, J., Tolliver, T. & Catignani, G., 1979. Simultaneous determination of alpha-tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. *Am J Clin Nutr*, 32(10), pp.2143–2149.
- Binder, M., 2004. Synthetic methionine saves resources. *Feed Mix*, 12, pp.31–34.
- Birben, E. et al., 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*, 5, pp.9–19.
- Blokhina, O., Virolainen, E. & Fagerstedt, K. V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany*, 91, pp.179–194.
- Brachet, P., Alvarado, F. & Puigserver, A., 1987. Kinetic evidence for separate systems in transport of D- and L-methionine by rat small intestine. *The American journal of physiology*, 252(3 Pt 1), pp.G320-4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3826371>.
- Brachet, P. & Puigserver, A., 1987. Transport of Methionine Hydroxy Analog across the Brush Border Membrane of Rat Jejunum¹. *The Journal of nutrition*, (82),

pp.1241–1246.

Brandsch, M. & Brandsch, C., 2003. Intestinal transport of amino acids, peptides and proteins. *Progress in Research on Energy and Protein Metabolism*, (109), pp.667–680.

Brigelius-Flohé, R., 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. In *Free Radical Biology and Medicine*. pp. 951–965.

Brigelius-Flohé, R., 2009. Vitamin E: The shrew waiting to be tamed. *Free Radical Biology and Medicine*.

Brosnan, J.T. et al., 2007. Methionine: A metabolically unique amino acid. *Livestock Science*, 112(1–2), pp.2–7.

Brosnan, J.T. & Brosnan, M.E., 2006. The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview. *The Journal of Nutrition*, 136, pp.1636–1640.

Bunchasak, C., 2009. Role of Dietary Methionine in Poultry Production. *Japanese poultry science*, 46, pp.169–179.

Buyse, J. & Decuypere, E., 1999. The role of the somatotrophic axis in the metabolism of the chicken. In *Domestic Animal Endocrinology*. pp. 245–255.

Castellano, R. et al., 2015. A methionine deficient diet enhances adipose tissue lipid metabolism and alters anti-oxidant pathways in young growing pigs. *PLoS ONE*, 10(7).

Celi, P. & Gabai, G., 2015. Oxidant/Antioxidant Balance in Animal Nutrition and Health: The Role of Protein Oxidation. *Frontiers in veterinary science*, 2(October), p.48.

Chance, B., 1979. Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*, 59(3), pp.527–605.

Chen, Y. et al., 2014. L-Methionine supplementation maintains the integrity and barrier function of the small-intestinal mucosa in post-weaning piglets. *Amino Acids*, 46(4), pp.1131–1142.

Cobb500, 2015. Introduction Cobb500 Broiler Performance & Nutrition Supplement.

Colton, C.A. & Gilbert, D.L., 1987. Production of superoxide anions by a CNS

- macrophage, the microglia. *FEBS Letters*, 223(2), pp.284–288.
- Conde-Aguilera, J.A. et al., 2014. The amino acid composition of tissue protein is affected by the total sulfur amino acid supply in growing pigs. *Animal*, 8(3), pp.401–409.
- Dänner, E.E. & Bessei, W., 2002. Effectiveness of liquid DL-methionine hydroxy analogue-free acid (DL-MHA-FA) compared to DL-methionine on performance of laying hens. *Arch. Geflügelk.*, 66, pp.97–101.
- Davies, M.J., 2016. Protein oxidation and peroxidation. *The Biochemical journal*, 473(7), pp.805–25.
- Deisseroth, A. & Dounce, A.L., 1970. Catalase: Physical and Chemical Properties, Mechanism of Catalysis, and Physiological Role Spectroscopic and Chemical Properties of Enzyme-Substrate Complexes of Catalase . . Spectroscopic and Magnetic Properties of Complexes of Catalase with Various. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS*, 50(3), pp.319–375.
- Dibner, J.J., Atwell, C.A. & Ivey, F.J., 1992. Effect of Heat Stress on 2-Hydroxy-4-(Methylthio)Butanoic Acid and DL-Methionine Absorption Measured In Vitro. *Poultry Science*, 71, pp.1900–1910.
- Dibner, J.J. & Buttin, P., 2002. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism 1 DESCRIPTION OF PROBLEM Gastrointestinal microbial populations—ubiquitous and heterogeneous—play a complex. *J. Appl. Poult. Res*, 11, pp.453–463.
- Dibner, J.J. & Knight, A.D., 1984. Conversion of 2-Hydroxy-4-(Methylthio)butanoic Acid to L-Methionine in the Chick: A Stereospecific Pathway. *J. Nutr*, 114, pp.1716–1723.
- Drew, M.D., Kessel, A.G. Van & Maenz, D.D., 2003. Absorption of Methionine and 2 - Hydroxy - 4 - Methylthiobutoanic Acid in Conventional and Germ - Free Chickens. *Poultry Science*, 82, pp.1149–1153.
- Von Engelhardt, W. et al., 1989. Absorption of Short-chain Fatty Acids and Their Role in the Hindgut of Monogastric Animals. *Animal Feed Science and Technology Elsevier Science Publishers B.V*, 23, pp.43–53.

- Esteve-Garcia, E. & Austic, R.E., 1993. Intestinal absorption and renal excretion of dietary methionine sources by the growing chicken. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 4(10), pp.576–587.
- Esteve-Garcia, E. & Llauroadó, L.L., 1997. Performance, breast meat yield and abdominal fat deposition of male broiler chickens fed diets supplemented with DL-methionine or DL-methionine hydroxy analogue free acid. *British poultry science*, 38:4(4), pp.397–404.
- Fang, Z. et al., 2010. Effects of dl-2-hydroxy-4-methylthiobutyrate on the first-pass intestinal metabolism of dietary methionine and its extra-intestinal availability. *British Journal of Nutrition*, 103(5), pp.643–651.
- Farke, J., 2011. *Studien zur Aminosäurenwirksamkeit beim Mastgeflügel unter spezifischer Betrachtung der schwefelhaltigen Aminosäuren*. Dissertation, Abteilung Tierernährungsphysiologie der Georg-August-Universität Göttingen.
- Finkel, T., 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *Journal of Cell Biology*, 194(1), pp.7–15.
- Finkelstein, J.D., 2006. Inborn Errors of Sulfur-Containing Amino Acid Metabolism. *The Journal of Nutrition*, 136, pp.1750–1754.
- Freeman, B.A. & Crapo, J.D., 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 47(5), pp.412–426.
- Freisleben, H.-J. & Packer, L., 1993. Free-radical scavenging activities, interactions and recycling of antioxidants. *Biochem. Soc.*, 21, pp.325–330.
- Fridovich, I., 1975. Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 44(1), pp.147–159.
- Fukai, T. & Ushio-Fukai, M., 2011. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & redox signaling*, 15(6), pp.1583–606.
- Gammone, M.A., Riccioni, G. & D’Orazio, N., 2015. Marine carotenoids against oxidative stress: Effects on human health. *Marine Drugs*, 13, pp.6226–6246.
- Giustarini, D. et al., 2013. Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-

- ethylmaleimide. *Nature Protocols*, 8(9), pp.1660–1669.
- Gorrini, C., Harris, I.S. & Mak, T.W., 2013. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12, pp.931–947. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrd4002>.
- Grant, C.M., 2001. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Molecular Microbiology*, 39(3), pp.533–541.
- Grebenstein, N. et al., 2014. alpha-Tocopherol transfer protein is not required for the discrimination against gamma-tocopherol in vivo but protects it from side-chain degradation in vitro. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58(5), pp.1052–1060.
- Griffith, O.W., 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical biochemistry*, 106(1), pp.207–212.
- Harper, A.E., Benevenga, N.J. & Wohlhueter, R.M., 1970. Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiological reviews*, 50(3), pp.428–558.
- Harter, J.M. & Baker, D.H., 1978. Factors Affecting Methionine Toxicity and Its Alleviation in Chick. *Journal of Nutrition*, 108(7), pp.1061–1070.
- Herrmann, J.M., Becker, K. & Dick, T.P., 2015. Highlight: Dynamics of Thiol-Based Redox Switches. *Biological Chemistry*, 396(5), pp.385–387.
- Höhn, A., König, J. & Grune, T., 2013. Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *Journal of Proteomics*, 92, pp.132–159.
- Husvéth, F. et al., 2000. Effects of saturated and unsaturated fats with vitamin E supplementation on the antioxidant status of broiler chicken tissues. *Acta Veterinaria Hungarica*, 48(1), pp.69–79. Available at: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034570385&partnerID=40>.
- Ingenbleek, Y. & Kimura, H., 2013. Nutritional essentiality of sulfur in health and disease. *Nutrition Reviews*, 71(7), pp.413–432.

- Jones, D.P., 2006. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9–10), pp.1865–1879.
- Jong, C.J., Azuma, J. & Schaffer, S., 2012. Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: Prevention of mitochondrial oxidant production. *Amino Acids*, 42(6), pp.2223–2232.
- Kansanen, E. et al., 2013. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biology*, 1(1), pp.45–49.
- Kaspar, J.W., Niture, S.K. & Jaiswal, A.K., 2009. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(9), pp.1304–1309.
- Killi, R. et al., 2015. Oxidative Stability and Physico-chemical Properties of Meat from Broilers Fed with Dietary Neem Leaf Powder, Spirulina and their Combination. *Not Sci Biol*, 7(74), pp.400–404.
- Kim, J., Cha, Y.N. & Surh, Y.J., 2010. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 690(1–2), pp.12–23.
- Kirkman, H.N. & Gaetani, G.F., 2007. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), pp.44–50.
- Kobayashi, A. et al., 2004. Oxidative Stress Sensor Keap1 Functions as an Adaptor for Cul3-Based E3 Ligase To Regulate Proteasomal Degradation of Nrf2. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 24(16), pp.7130–7139.
- Kratzer, D.D. & Littell, R.C., 2006. APPROPRIATE STATISTICAL METHODS FOR COMPARING SOURCES OF NUTRITIONAL METHIONINE. *Poultry science*, 85(5), pp.947–954. Available at: <http://newprairiepress.org/agstatconference>.
- Kubista, M. et al., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*.
- Lawrence, R.A. & Burk, R.F., 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and biophysical research communications*, 71(4), pp.952–958.
- Lemme, a et al., 2002. Relative effectiveness of methionine hydroxy analog compared to DL-methionine in broiler chickens. *Poultry science*, 81(6), pp.838–

845.

- Lerner, J. & Wight Taylor, M., 1967. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA 991 BBA 75058 A COMMON STEP IN THE INTESTINAL ABSORPTION MECHANISMS OF D- AND L-METHIONINE*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 135, pp.990–999.
- Levine, R.L. et al., 1996. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(26), pp.15036–15040. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.93.26.15036>.
- Li, H.H. et al., 2004. Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *Journal of Clinical Investigation*, 114(8), pp.1058–1071.
- Lillehoj, H.S. & Trout, J.M., 1996. Avian Gut-Associated Lymphoid Tissues and Intestinal Immune Responses to Eimeria Parasites. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 9(3), pp.349–360.
- Liu, H. et al., 2015. Methionine and cystine double deprivation stress suppresses glioma proliferation via inducing ROS/autophagy. *Toxicology Letters*, 232(2), pp.348–355.
- Liu, Z. et al., 2004. Estimation of bioavailability of DL-methionine hydroxy analogue relative to DL-methionine in layers with exponential and slope-ratio models. *Poultry science*, 83(9), pp.1580–1586.
- Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, pp.164–175.
- Lykkesfeldt, J. & Svendsen, O., 2007. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *Veterinary Journal*, 173(3), pp.502–511.
- Ma, Q., 2013. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53, pp.401–426.
- Malik, G. et al., 2009. Apparent absorption of methionine and 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid from gastrointestinal tract of conventional and gnotobiotic pigs. *Animal*, 3(10), pp.1378–1386.
- Mamelak, M., 2007. Alzheimer' s disease, oxidative stress and gammahydroxybutyrate. *Neurobiology of Aging*, 28(9), pp.1340–1360.

- Marí, M. et al., 2009. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxidants & redox signaling*, 11(11), pp.2685–2700.
- MARKLUND, S. & MARKLUND, G., 1974. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47(3), pp.469–474.
- Martín-Venegas, R. et al., 2013. The methionine precursor DL-2-hydroxy-(4-methylthio)butanoic acid protects intestinal epithelial barrier function. *Food Chemistry*, 141(3), pp.1702–1709.
- Martín-Venegas, R., Geraert, P.A. & Ferrer, R., 2006. Conversion of the Methionine Hydroxy Analogue DL-2-Hydroxy-(4-Methylthio) Butanoic Acid to Sulfur-Containing Amino Acids in the Chicken Small Intestine 1. *Poultry Science*, 85, pp.1932–1938.
- McCord, J.M. & Fridovich, I., 1969. Superoxide Dismutase AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN)*. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(22), pp.6049–6065.
- Meister, A. & Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem*, 52, pp.711–760.
- Métayer, S. et al., 2008. Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(4), pp.207–215.
- Metz, G., 1995. ANTIOXIDATIVE VITAMINE IN DER PRAVENTION. *Pharmazeutische Zeitung*, 140(2), pp.32–34.
- Mezzetti, A., 1990. Glutathione Peroxidase, Glutathione Reductase and Glutathione Transferase Activities in the Human Artery, Vein and Heart. *J Mol Cell Cardiol*, 22, pp.935–938.
- Miller, J.K., Brzezinskaslebodzlnskal, E. & Madsen, F.C., 1993. Oxidative Stress, Antioxidants, and Animal Function. *Journal of dairy science*, 76, pp.2812–2823.
- Mitchell, M.A. & Lemme, A., 2008. Examination of the composition of the luminal fluid in the small intestine of broilers and absorption of amino acids under various ambient temperatures measured in vivo. *International Journal of Poultry Science*,

7(3), pp.223–233.

Moughan, P.J., Ravindran, V. & Sorbara, J.O., 2014. Dietary protein and amino acids-consideration of the undigestible fraction. *Poult Sci*, 93(9), pp.2400–2410.

Mullis, K. et al., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51(1), pp.263–273.

Necas, J. et al., 2008. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*, 53(8), pp.397–411.

Nguyen, T., Nioi, P. & Pickett, C.B., 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), pp.13291–13295.

NRC, (National Research Council), 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*, Washington, D.C.: National Academy Press.

Payne, R.L. et al., 2006. ORIGINAL ARTICLE Bioavailability of methionine hydroxy analog-free acid relative to DL-methionine in broilers. *Animal Science*, 14, pp.427–439.

Pisoschi, A.M. & Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, pp.55–74.

Powell, C.D., Chowdhury, M.A.K. & Bureau, D.P., 2015. Assessing the bioavailability of L-methionine and a methionine hydroxy analogue (MHA-Ca) compared to DL-methionine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 48(1), pp.1–15.

Putnam, C.D. et al., 2000. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 296(1), pp.295–309.

Ramnath, V., Rekha, P.S. & Sujatha, K.S., 2008. Amelioration of heat stress induced disturbances of antioxidant defense system in chicken by Brahma Rasayana. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 5(1), pp.77–84.

Rangel-Lugo, M. & Austic, R.E., 1998. Transamination of 2-Oxo-4-[Methylthio]Butanoic Acid in Chicken Tissues. *Poultry science*, 77, pp.98–104.

- Reid, T.J. et al., 1981. Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5. Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78(8), pp.4767–4771.
- Richards, J.D., Atwell, C.A. & Va, M., 2005. Comparative In Vitro and In Vivo Absorption of 2-Hydroxy-4 (Methylthio) Butanoic Acid and Methionine in the Broiler Chicken. *Poultry science*, 4(84), pp.1397–1405.
- Salami, S.A. et al., 2015. Efficacy of dietary antioxidants on broiler oxidative stress, performance and meat quality: Science and market. *Avian Biology Research*, 8(2), pp.65–78.
- Sanz, A., 2016. Mitochondrial reactive oxygen species: Do they extend or shorten animal lifespan? *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1857(8), pp.1116–1126.
- Sauer, N. et al., 2008. Meta - Analysis of the Relative Efficiency of Methionine - Hydroxy - Analogue - Free - Acid Compared with dl - Methionine in Broilers Using Nonlinear Mixed Models. *Poultry Science*, 87, pp.2023–2031.
- Schieber, M. & Chandel, N.S., 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 24(10), pp.453–462.
- Schrader, M. & Fahimi, H.D., 2006. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*.
- Shaaban, G., Mézes, M. & Hidas, A., 2003. Phenotypic variation of glutathione peroxidase activity in different genotypes of different age groups of chicken and its correlation with some production traits. *Arch. Geflügelk.*, 67, pp.217–224.
- Shen, Y.B. et al., 2015. Effects of feed grade L-methionine on intestinal redox status, intestinal development, and growth performance of young chickens compared with conventional DL-methionine. *Journal of Animal Science*, 93(6), pp.2977–2986.
- Shen, Y.B., Weaver, A.C. & Kim, S.W., 2014. Effect of feed grade L-methionine on growth performance and gut health in nursery pigs compared with conventional DL-methionine. *Journal of Animal Science*, 92(12), pp.5530–5539.
- Sies, H., 1986. Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 25(12), pp.1058–1071.

- Sies, H., 1990. Carotinoide Übersicht. *Deutsches Ärzteblatt*, 87(14), pp.1108–1111.
- Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*, 82, pp.291–295.
- Sigma-Aldrich, 2016. Protein Carbonyl Assay Kit. , pp.1–9.
- Summers, J.D., Spratt, D. & Atkinson, J.L., 1992. Broiler weight gain and carcass composition when fed diets varying in amino acid balance, dietary energy, and protein level. *Poultry science*, 71(2), pp.263–273.
- Surai, P.F., 2015. Antioxidant Systems in Poultry Biology : Superoxide Dismutase. *Journal of Animal Research and Nutrition*, 1(1:8), pp.1–17.
- Surai, P.F., 1999. British Poultry Science Tissue-specific changes in the activities of antioxidant enzymes during the development of the chicken embryo Tissue-specific changes in the activities of antioxidant enzymes during the development of the chicken embryo. *British Poultry Science*, 40, pp.397–405. Available at: <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=cbps20>.
- Sutter, B.M. et al., 2013. XMethionine inhibits autophagy and promotes growth by inducing the SAM-responsive methylation of PP2A. *Cell*, 154(2), pp.403–415.
- Swennen, Q. et al., 2011. Effects of dietary protein content and 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid or DL-methionine supplementation on performance and oxidative status of broiler chickens. *British Journal of Nutrition*, 106, pp.1845–1854.
- Tan, G.Y. et al., 2010. Effects of different acute high ambient temperatures on function of hepatic mitochondrial respiration, antioxidative enzymes, and oxidative injury in broiler chickens. *Poultry Science*, 89(1), pp.115–122.
- Thornton, B. & Basu, C., 2011. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*.
- Tietze, F., 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical biochemistry*, 27(3), pp.502–522.
- Tkachev, V.O., Menshchikova, E.B. & Zenkov; N.K., 2011. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE Signaling System. *Biochemistry (Moscow)*, 76(4), pp.407–422.

- Traber, M.G. & Atkinson, J., 2007. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), pp.4–15.
- Traber, M.G. & Sies, H., 1996. VITAMIN E IN HUMANS: Demand and Delivery. *ANIU Rev. Nurr*, 16, pp.321–17.
- Vandesompele, J. et al., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(711), pp.34–1. Available at: <http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034.1>.
- Vázquez-Añ, M. et al., 2006. Evidence for 2-Hydroxy-4(Methylthio) Butanoic Acid and DL-Methionine Having Different Dose Responses in Growing Broilers. *Poultry Science*, 85, pp.1409–1420.
- Del Vesco, A.P. et al., 2015. Effects of methionine supplementation on the expression of protein deposition-related genes in acute heat stress-exposed broilers. *PLoS ONE*, 10(2), pp.1–11.
- Del Vesco, A.P. Del et al., 2014. Effects of methionine supplementation on the redox state of acute heat stress–exposed quails 1. *J. Anim. Sci*, 92, pp.806–815.
- Vieira, S.L. et al., 2004. METABOLISM AND NUTRITION Responses of Growing Broilers to Diets with Increased Sulfur Amino Acids to Lysine Ratios at Two Dietary Protein Levels. *Poultry Science*, 83, pp.1307–1313.
- Vossen, E. et al., 2011. Effect of dietary antioxidant supplementation on the oxidative status of plasma in broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95(2), pp.198–205.
- Wiedemann, C., Schulz, H.L. & Weber, B.H.F., 2004. Quantitative Real-Time PCR – Eine Frage der Normalisierung. *BioSpektrum*, 10(1), pp.99–102.
- Willemsen, H. et al., 2011. Effects of dietary supplementation of methionine and its hydroxy analog DL-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid on growth performance, plasma hormone levels, and the redox status of broiler chickens exposed to high temperatures. *Poultry Science*, 90, pp.2311–2320.
- Wu, G. et al., 2004. Recent Advances in Nutritional Sciences Glutathione Metabolism and Its Implications for Health 1. *Environmental Health*, 134(December 2003),

- pp.489–492. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14988435>.
- Yin, H., Xu, L. & Porter, N.A., 2011. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), pp.5944–5972.
- Zeitz, J.O. et al., 2018. Tissue and plasma antioxidant status in response to dietary methionine concentration and source in broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(4), pp.999–1011.
- Zhang, S. et al., 2016. Physiological and biochemical aspects of methionine isomers and a methionine analogue in broilers. *Poultry Science*, 96, pp.425–439.
Available at: <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew253>.
- Zhang, Z. et al., 2014. Taurine supplementation reduces oxidative stress and protects the liver in an iron-overload murine model. *Molecular Medicine Reports*, 10(5), pp.2255–2262.
- Zou, L. et al., 2015. Effects of DL-2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid on broilers at different dietary inclusion rates. *British Poultry Science*, 56(3), pp.337–344.
Available at:
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00071668.2015.1021296>.

11 Anhang

Tabelle 48: Nährstoffgehalte der Vormischung Premix. Identisch für Starter, Grower und Finisher (nach MIAVIT GmbH, 2013)¹

Inhaltsstoffe	in der Mischung/ kg	Soll	je kg Endfutter
Rohprotein	0,07245 %	0,00	0,00 %
Rohasche	89,95573 %	0,00	0,90 %
HCL-unlösliche Asche	11,82706 %	0,00	0,12 %
Trockensubstanz	98,53426 %	0,00	0,99 %
Calcium	29,95540 %	0,00	0,30 %
Phosphor	0,00223 %	0,00	0,00 %
Natrium	0,00008 %	0,00	0,00 %
Magnesium	0,00065 %	0,00	0,00 %
Kalium	0,00290 %	0,00	0,00 %
Chlor	1,00815 %	0,00	0,01 %
Vitamin A	1200000 i.E.	12000,00	12000 i.E.
Vitamin D3	400000 i.E.	4000,00	4000 i.E.
Vitamin E (a-Tocopherylacetat)	5000 mg	50,00	50 mg
Vitamin K3	333,34 mg	0,00	3,33 mg
Vitamin H (Biotin)	25000 mcg	250,00	250 mcg
Folsäure	166,68 mg	0,00	1,67 mg
Vitamin B1 (-mononitrat)	333,34 mg	0,00	3,33 mg
Vitamin B2	800 mg	8,00	8 mg
Vitamin B6	416,67 mg	0,00	4,17 mg
Vitamin B12	2500 mcg	0,00	25 mcg
Nikotinamid	6907 mg	0,00	69,07 mg
Calpan (Calciumpantothenat)	2000 mg	0,00	20 mg
Cholinchlorid	40000 mg	400,00	400 mg
Eisen (Sulfat)	5000 mg	50,00	50 mg
Kupfer (Sulfat)	1500 mg	15,00	15 mg
Mangan (Oxid)	10000 mg	100,00	100 mg
Zink (Oxid)	7000 mg	70,00	70 mg
Jod (Ca-Jodat)	156,25 mg	0,00	1,56 mg
Selen (Na-Selenit)	25 mg	0,25	0,25 mg

¹ es handelt sich um eine Vormischung mit Abgabebeschränkung und kein konventionell erhältliches Standardprodukt

Tabelle 49: Auswirkungen der Fütterung von DLM und MHA mit je drei verschiedenen Methioninzulagen auf die Leistungsdaten in der gesamten Fütterungsperiode und 3 Versuchsdurchgängen

Gesamte Fütterungs- periode (Tag 1-35)	Durchgang	Kontrolle	DLM 0,1	DLM 0,25	DLM 0,4	MHA 0,1	MHA 0,25	MHA 0,4	SD gepoolt	P-Werte Durchgang
Anfangskörpergewicht (g)	1	41,5	41,5	41,4	41,5	41,5	41,5	41,5	3,203	
	2	36,3	36,3	36,3	36,3	36,2	36,3	36,7	2,8	<0,001
	3	42,1	42,0	42,7	43,1	43,1	42,7	42,7	3,002	
Endkörpergewicht (g)	1	1903	2693	2748	2711	2776	2809	2933	379,3	
	2	1719	2408	2553	2503	2366	2418	2530	380,9	<0,001
	3	1865	2542	2567	2688	2651	2592	2638	439,2	
Gewichtszunahme (g)	1	1862	2651	2707	2669	2733	2767	2892	379,5	
	2	1683	2371	2517	2467	2328	2381	2493	380,4	<0,001
	3	1824	2500	2524	2645	2607	2549	2595	438,7	
durchschn. tägl. Zunahme (g)	1	53,2	75,7	77,3	76,2	78,1	79,0	82,6	10,84	
	2	48,1	67,7	71,9	70,5	66,5	68,0	71,2	10,87	<0,001
	3	52,1	71,4	72,1	75,6	74,5	72,8	74,2	12,53	
Gesamte FA (g)	1	3189	3644	3878	3778	4069	3999	4055	330,5	
	2	2980	3589	3428	3615	3629	3514	3511	277,5	0,018
	3	3198	3833	3708	3890	3756	3741	3761	264,4	
durchschn. tägl. FA (g)	1	91	104	111	108	116	114	116	9,4	
	2	85	103	98	103	104	100	100	7,9	0,018
	3	91	110	106	111	107	107	107	7,6	
Futterverwertung	1	1,72	1,40	1,43	1,42	1,52	1,45	1,40	0,11	
	2	1,77	1,51	1,35	1,43	1,53	1,38	1,38	0,15	0,236
	3	1,68	1,51	1,42	1,41	1,43	1,43	1,39	0,11	

Tabelle 50: Auswirkungen der Fütterung von DLM und MHA mit je drei verschiedenen Methioninzulagen auf die Schlachtkörperdaten in der gesamten Fütterungsperiode und 3 Versuchsdurchgängen

Gesamte Fütterungs- periode (Tag 1-35)	Durchgang	Kontrolle	DLM 0,1	DLM 0,25	DLM 0,4	MHA 0,1	MHA 0,25	MHA 0,4	SD gepoolt	P-Werte Durchgang
Schlachtgewicht (g)	1	1420	1949	2001	1987	1952	2049	2206	259	
	2	1147	1763	1850	1877	1807	1880	1916	296	<0,001
	3	1192	1994	1982	1976	1877	1909	2089	313	
Ausschlachtgewicht (%)	1	69,1	73,5	73,6	73,3	72,1	73,7	74,9	2,4	
	2	67,8	73,3	72,8	74,0	71,8	74,1	73,8	2,6	0,87
	3	68,5	74,2	74,3	71,7	71,9	72,6	74,8	2,7	
Brustmuskel (g)	1	309	533	546	541	477	539	629	105	
	2	237	502	518	521	454	491	558	118	0,17
	3	254	563	527	566	486	510	592	121	
Brustmuskel (% SG)	1	21,6	27,3	27,2	27,2	24,4	26,3	28,5	2,6	
	2	20,5	28,4	27,9	27,8	25,0	26,0	29,1	3,3	0,60
	3	21,2	28,3	26,5	28,7	25,8	26,6	28,3	3,0	
Leber (% LM)	1	2,24	1,65	1,77	1,80	1,67	1,61	1,56	0,28	
	2	2,16	1,64	1,54	1,75	1,85	1,86	1,90	0,23	0,001
	3	2,06	1,84	1,55	1,58	1,90	1,67	1,71	0,19	
Abdominales FG (% LM)	1	1,75	1,69	1,77	1,80	1,46	1,57	1,75	0,28	
	2	1,86	1,64	1,54	1,75	1,77	1,76	1,35	0,36	0,74
	3	2,18	1,84	1,55	1,58	1,65	1,38	1,93	0,45	
Nieren (% LM)	1	0,71	0,54	0,51	0,53	0,56	0,55	0,53	0,08	
	2	0,80	0,50	0,48	0,49	0,58	0,53	0,50	0,13	0,11
	3	0,67	0,56	0,49	0,47	0,56	0,51	0,49	0,08	

Anhang

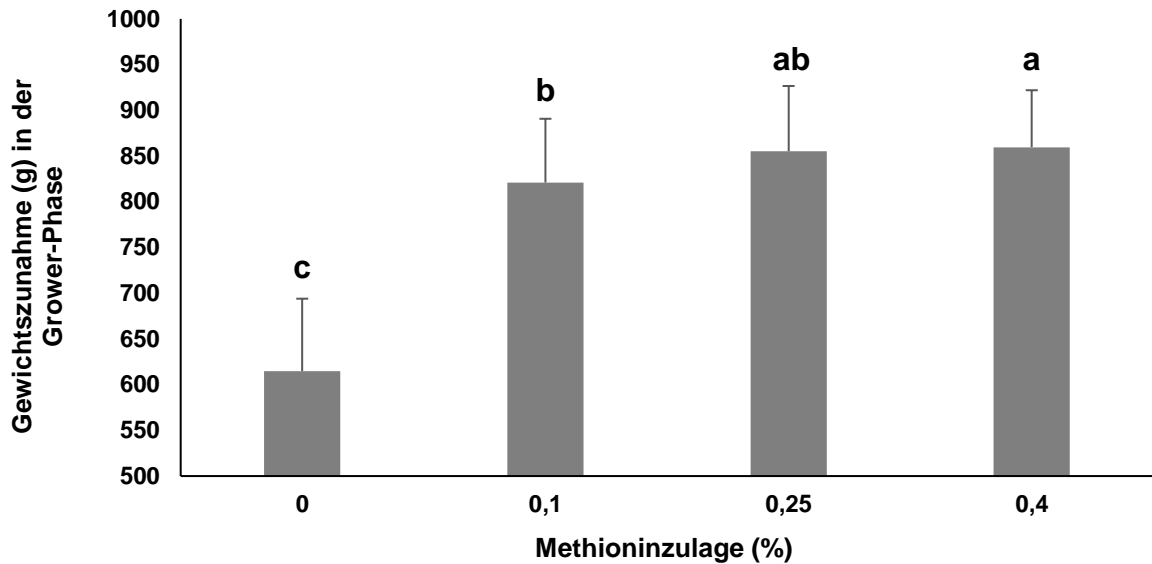


Abbildung 23: Gewichtszunahme pro Tier (g) in der Grower-Phase Phase (Tag 35). Es wurden nur die Methioninkonzentrationen berücksichtigt und die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Balken mit unterschiedlichen Signifikanzbuchstaben unterscheiden sich auf einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$

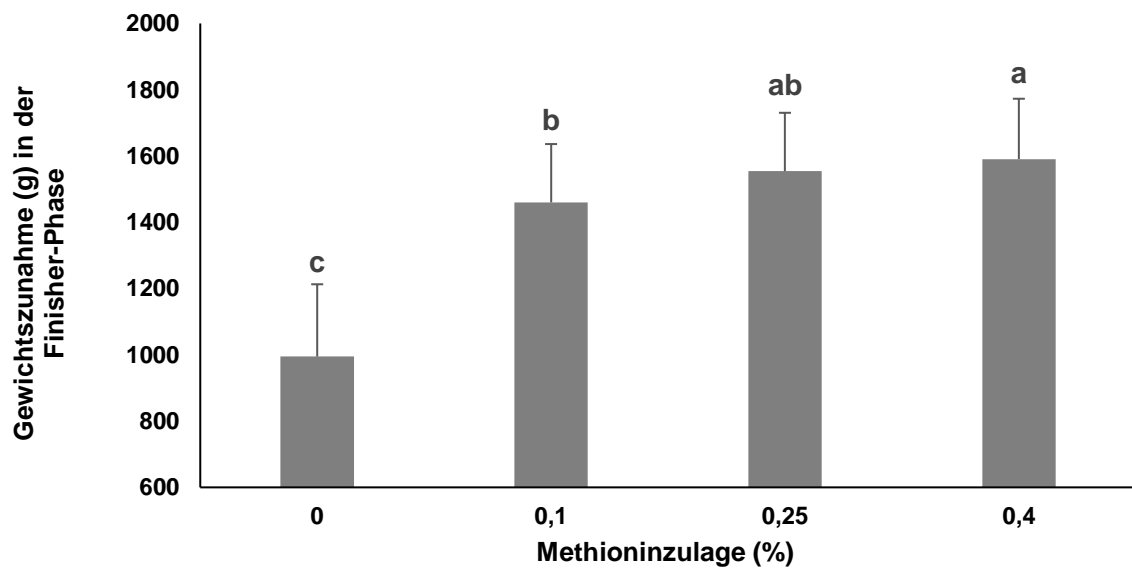


Abbildung 24: Gewichtszunahme pro Tier (g) in der Finisher-Phase Phase (Tag 35). Es wurden nur die Methioninkonzentrationen berücksichtigt und die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Balken mit unterschiedlichen Signifikanzbuchstaben unterscheiden sich auf einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$

Anhang

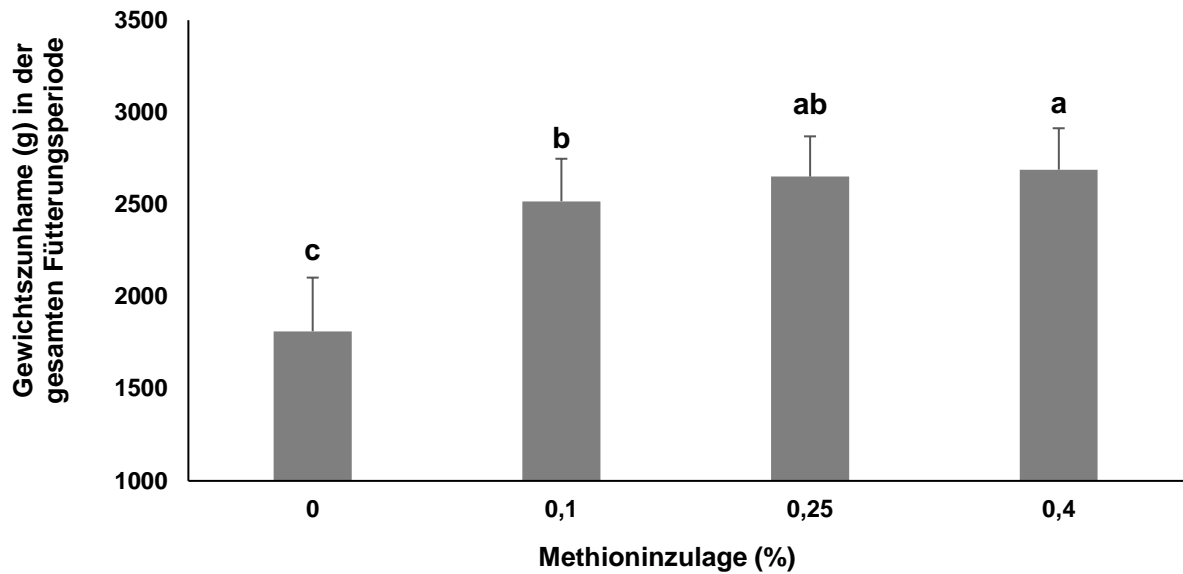


Abbildung 25: Gewichtszunahme pro Tier (g) in der gesamten Fütterungsperiode Phase (Tag 0- Tag 35). Es wurden nur die Methioninkonzentrationen berücksichtigt und die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Balken mit unterschiedlichen Signifikanzbuchstaben unterscheiden sich auf einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$

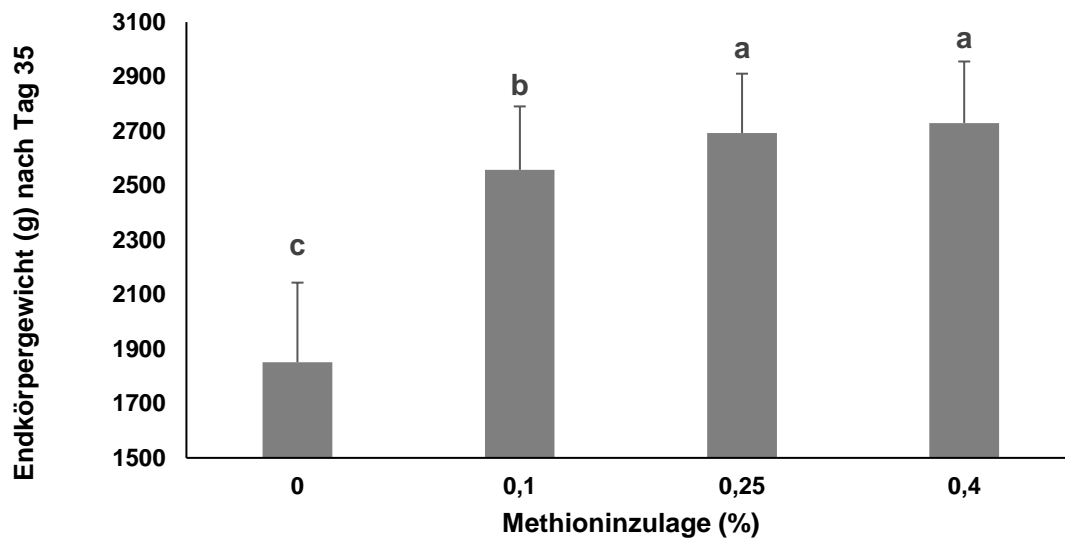


Abbildung 26: Endkörpergewichte pro Tier (g) nach der Finisher-Phase Phase (Tag 35). Es wurden nur die Methioninkonzentrationen berücksichtigt und die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Balken mit unterschiedlichen Signifikanzbuchstaben unterscheiden sich auf einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$

Anhang

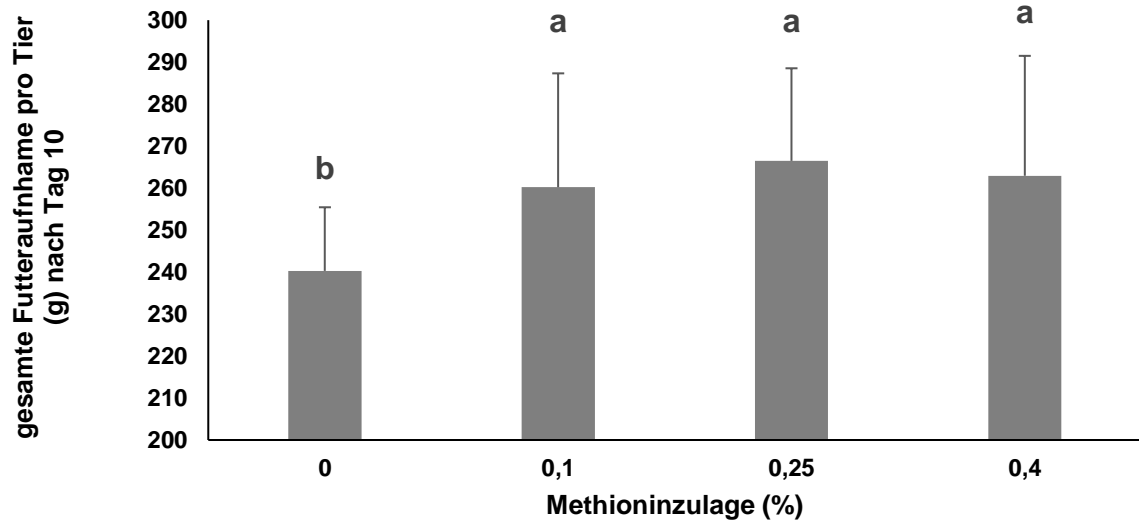


Abbildung 27: Gesamte Futteraufnahme pro Tier (g) nach der Starter-Phase (Tag 35). Es wurden nur die Methioninkonzentrationen berücksichtigt und die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Balken mit unterschiedlichen Signifikanzbuchstaben unterscheiden sich auf einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$

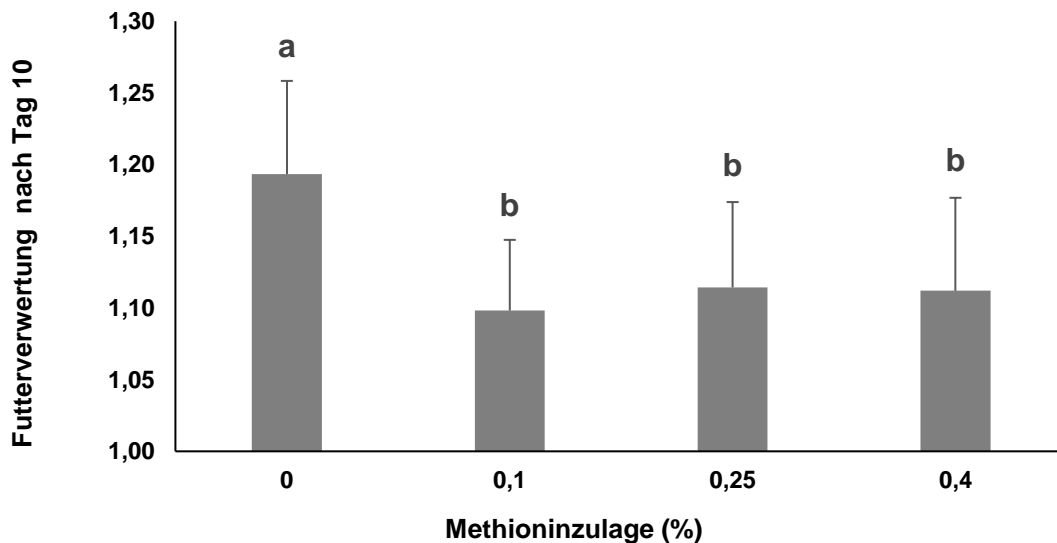


Abbildung 28: Futterverwertung nach der Starter-Phase (Tag 10). Es wurden nur die Methioninkonzentrationen berücksichtigt und die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Balken mit unterschiedlichen Signifikanzbuchstaben unterscheiden sich auf einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$

Anhang

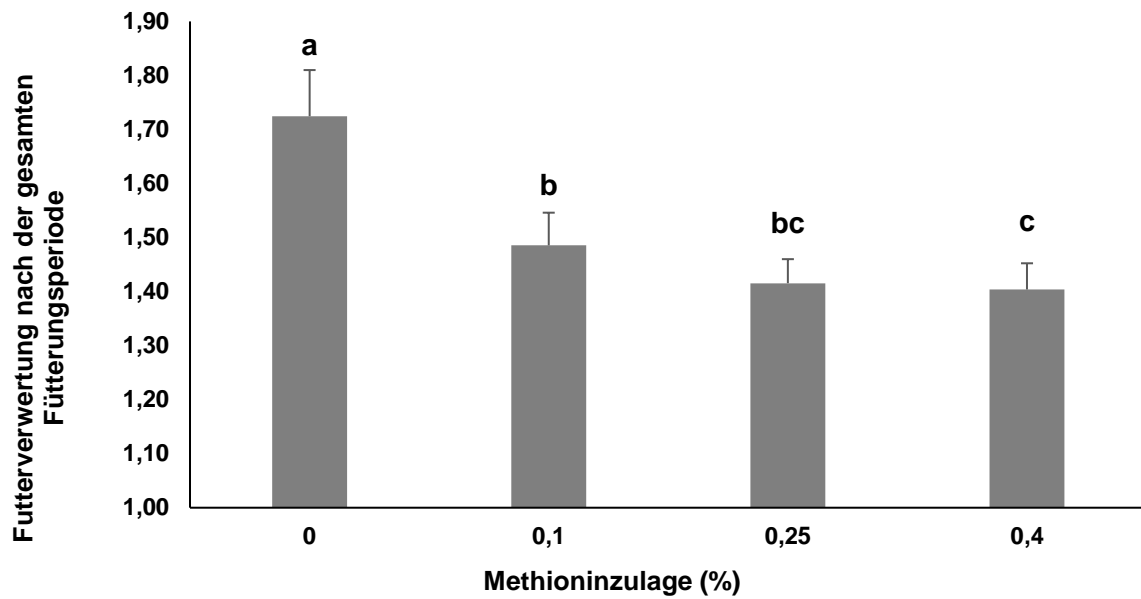


Abbildung 29: Futterverwertung nach der gesamten Fütterungsperiode Phase (Tag 0-Tag 35). Es wurden nur die Methioninkonzentrationen berücksichtigt und die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Balken mit unterschiedlichen Signifikanzbuchstaben unterscheiden sich auf einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$

Anhang

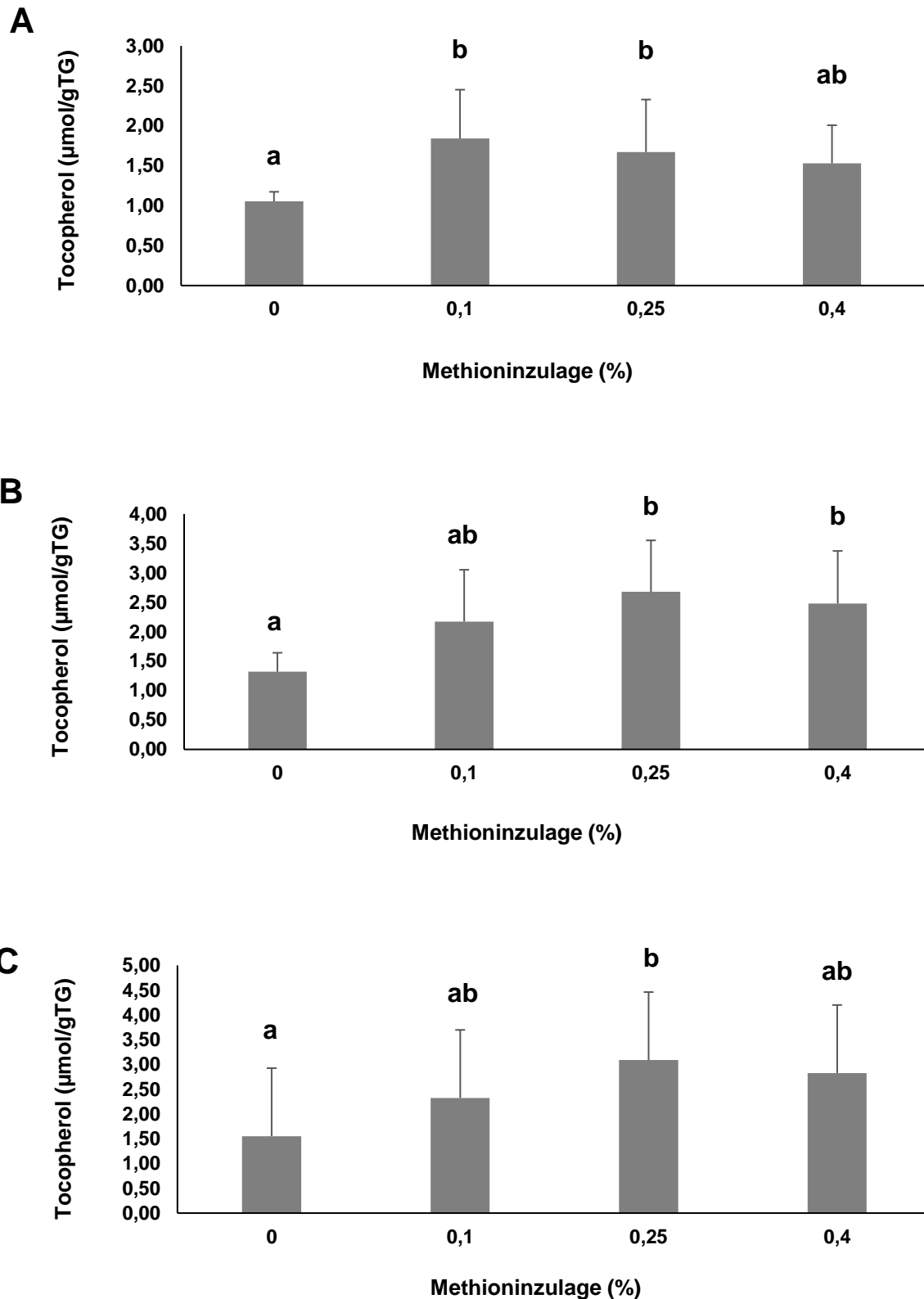


Abbildung 30: Tocopherolkonzentrationen (µmol/g TG) in der Leber nach der Starter- (A), Grower- (B) und Finisher-Phase (C). Es wurden nur die Methioninkonzentrationen berücksichtigt und die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Balken mit unterschiedlichen Signifikanzbuchstaben unterscheiden sich auf einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$; TG= Triglyceride

Anhang

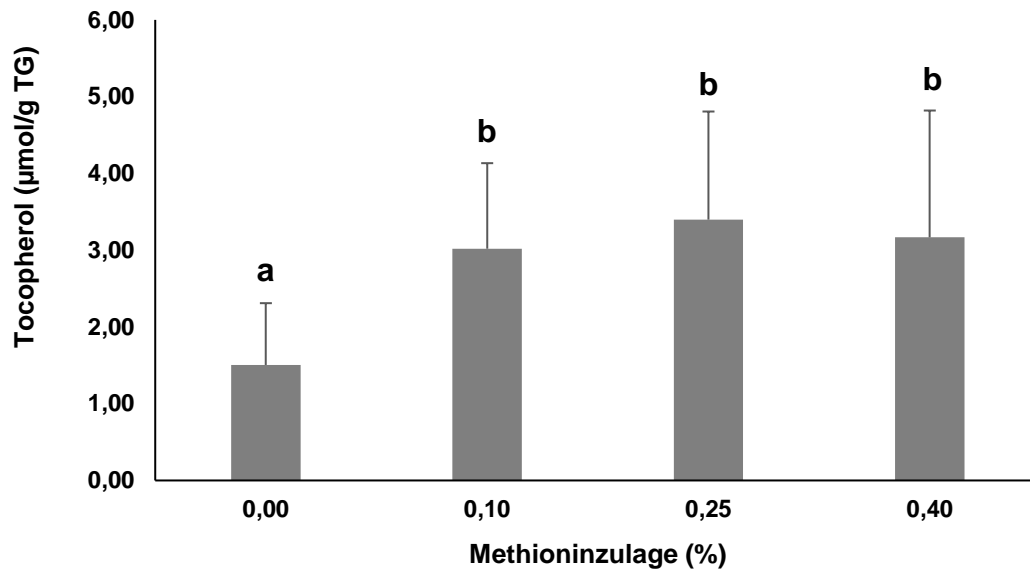


Abbildung 31: Tocopherolkonzentrationen (µmol/g TG) in der Jejunummucosa nach der Finisher-Phase. Es wurden nur die Methioninkonzentrationen berücksichtigt und die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Balken mit unterschiedlichen Signifikanzbuchstaben unterscheiden sich auf einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$; TG= Triglyceride

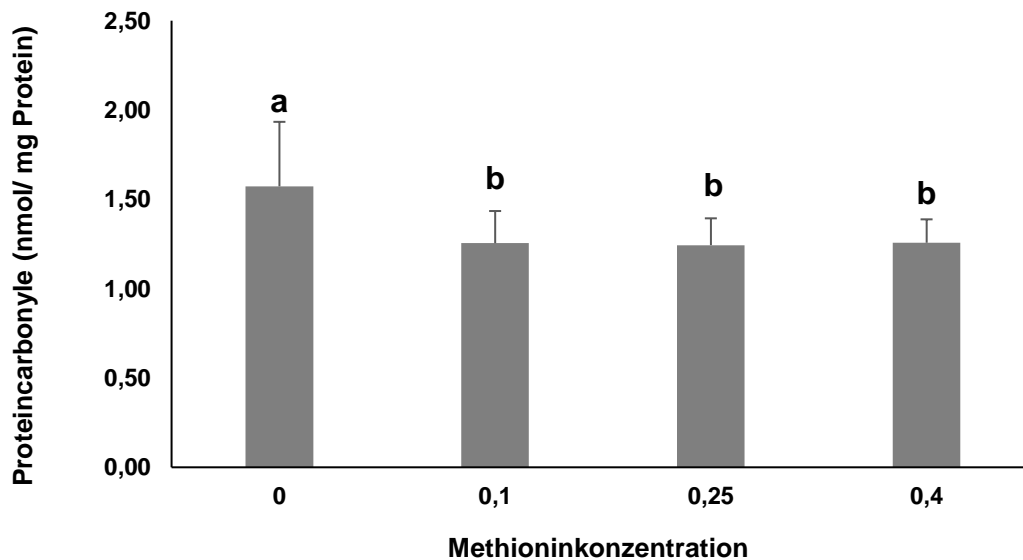


Abbildung 32: PC-Konzentrationen (nmol/mg Protein) im Plasma nach der Finisher-Phase. Es wurden nur die Methioninkonzentrationen berücksichtigt und die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Balken mit unterschiedlichen Signifikanzbuchstaben unterscheiden sich auf einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$

Anhang

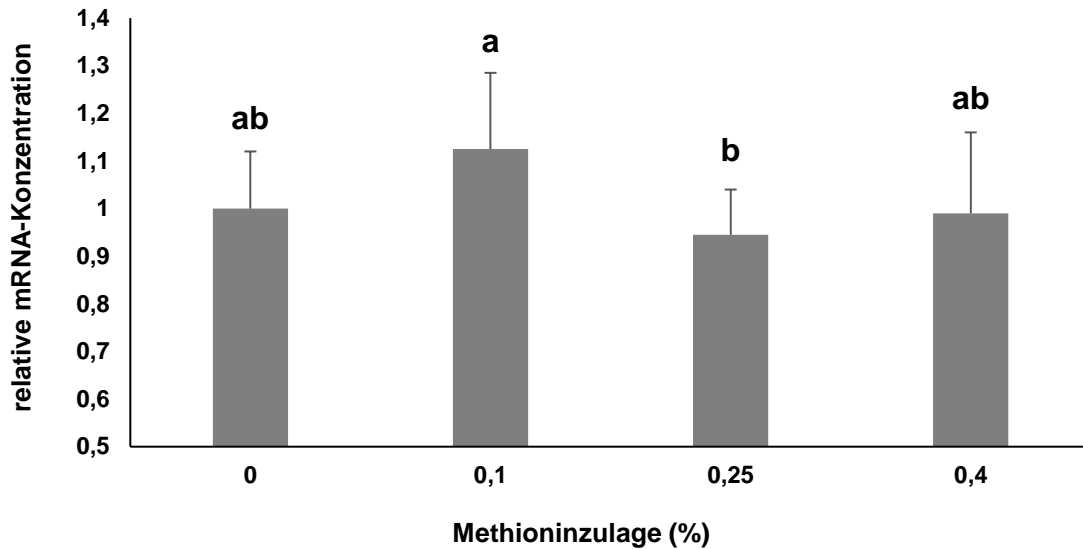


Abbildung 33: Relative mRNA-Konzentration der SOD im Nierengewebe nach der Starter-Phase. Es wurden nur die Methioninkonzentrationen berücksichtigt und die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Balken mit unterschiedlichen Signifikanzbuchstaben unterscheiden sich auf einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$

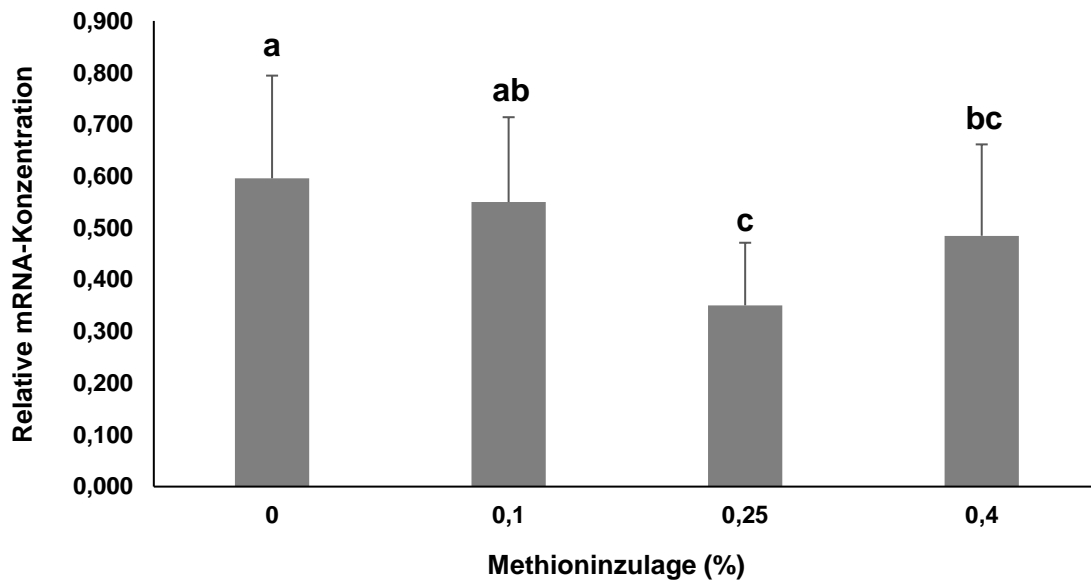


Abbildung 34: Relative mRNA-Konzentration der GPx7 in der Jejunummucosa nach der Finisher-Phase. Es wurden nur die Methioninkonzentrationen berücksichtigt und die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Balken mit unterschiedlichen Signifikanzbuchstaben unterscheiden sich auf einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$

Anhang

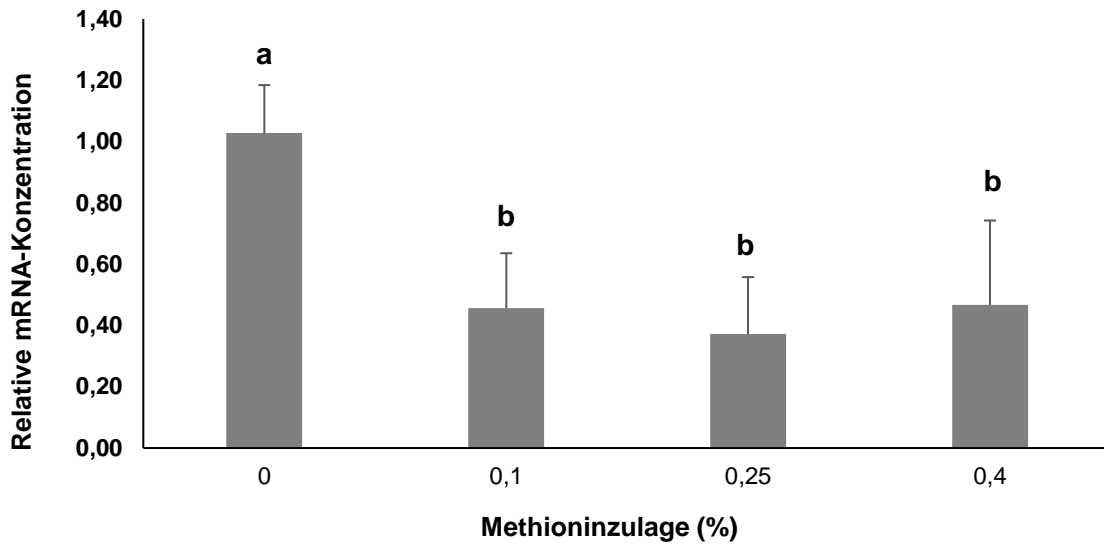


Abbildung 35: Relative mRNA-Konzentration der GPx2 in der Jejunummucosa nach der Finisher-Phase. Es wurden nur die Methioninkonzentrationen berücksichtigt und die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Balken mit unterschiedlichen Signifikanzbuchstaben unterscheiden sich auf einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$

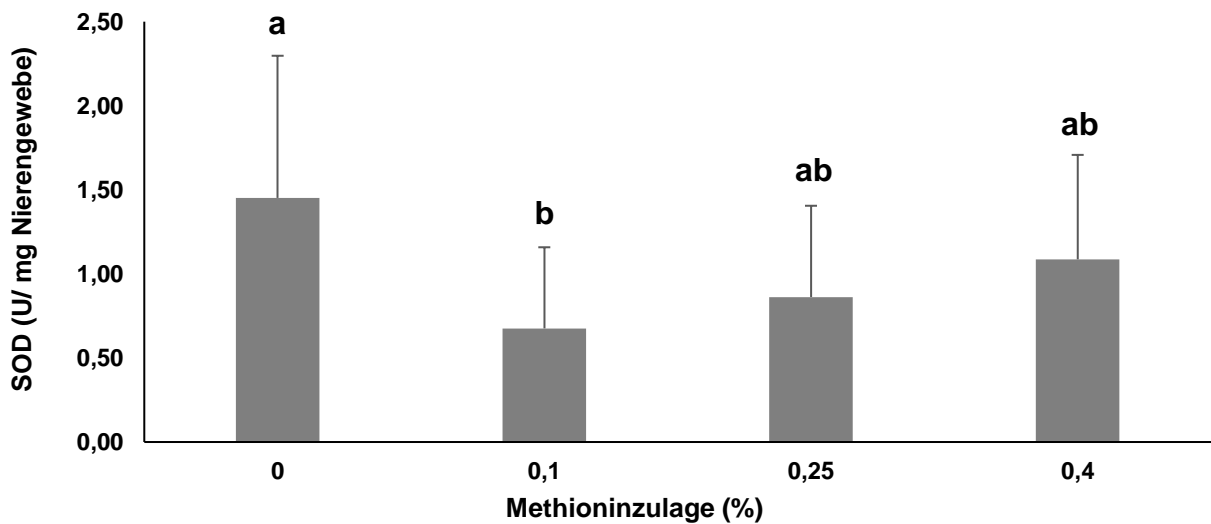


Abbildung 36: SOD-Aktivität im Nierengewebe nach der Grower-Phase. Es wurden nur die Methioninkonzentrationen berücksichtigt und die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Balken mit unterschiedlichen Signifikanzbuchstaben unterscheiden sich auf einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$; SOD= Superoxiddismutase, U= Unit

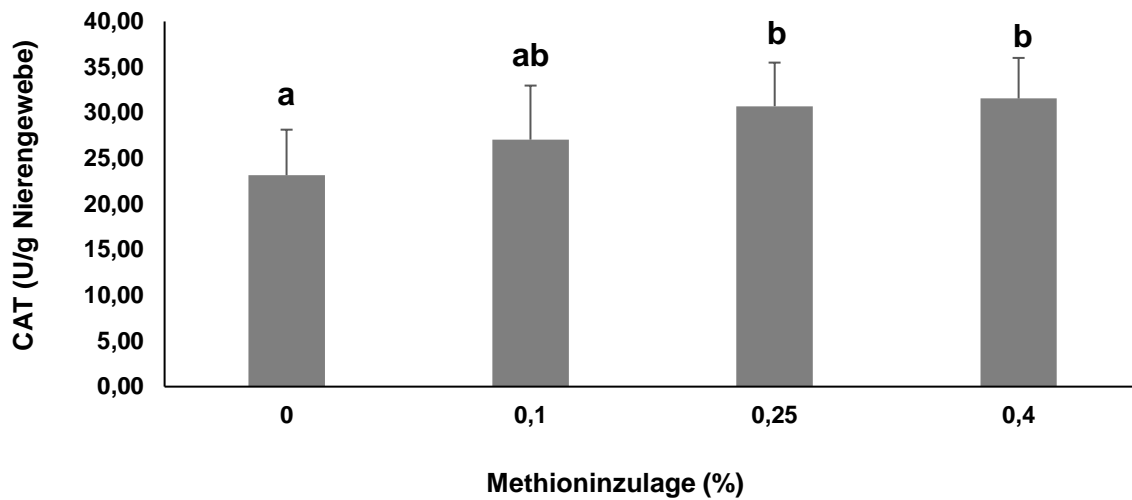


Abbildung 37: CAT-Aktivität im Nierengewebe nach der Grower-Phase. Es wurden nur die Methioninkonzentrationen berücksichtigt und die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Balken mit unterschiedlichen Signifikanzbuchstaben unterscheiden sich auf einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$; CAT= Katalase, U= Unit

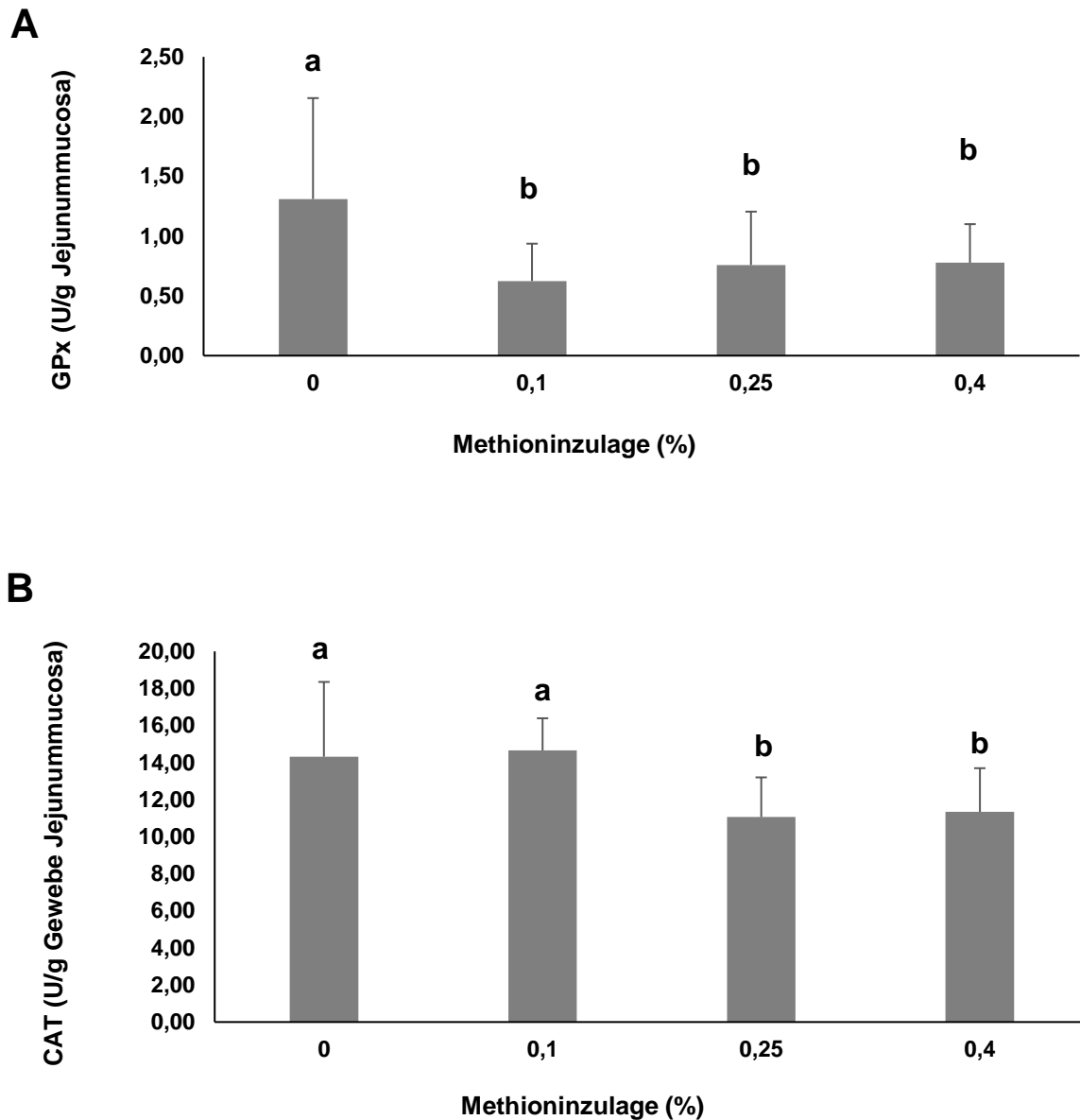


Abbildung 38: GPx- (A) und CAT- Aktivität (B) in der Jejenummucosa nach der Starter-Phase. Es wurden nur die Methioninkonzentrationen berücksichtigt und die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Balken mit unterschiedlichen Signifikanzbuchstaben unterscheiden sich auf einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$; CAT= Katalase, SOD= Superoxiddismutase, U= Units

Anhang

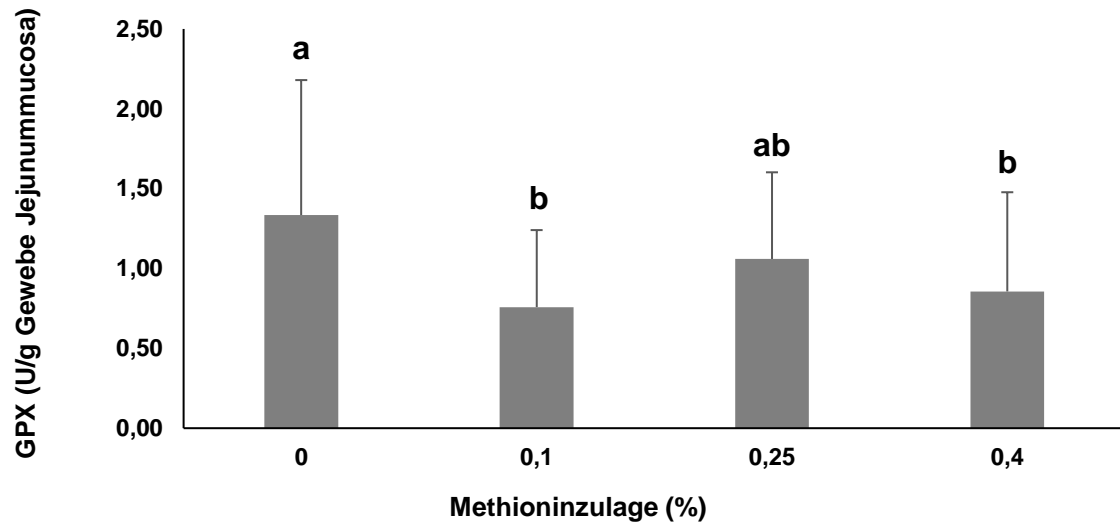


Abbildung 39: GPx-Aktivität in der Jejunummucosa nach der Grower-Phase. Es wurden nur die Methioninkonzentrationen berücksichtigt und die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Balken mit unterschiedlichen Signifikanzbuchstaben unterscheiden sich auf einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$; GPx= Glutathionperoxidase, U= Units

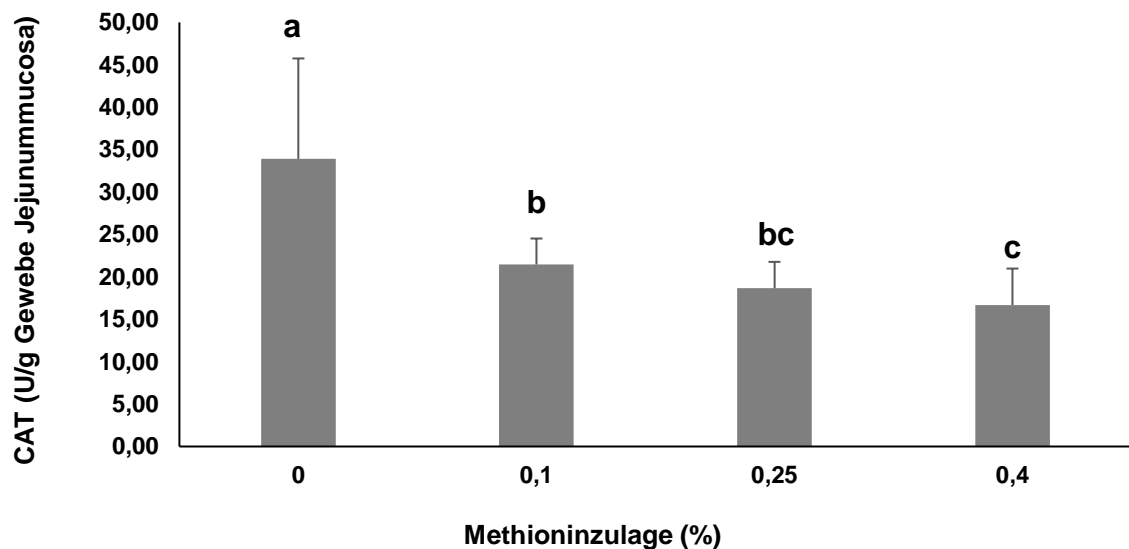


Abbildung 40: CAT-Aktivität in der Jejunummucosa nach der Finisher-Phase. Es wurden nur die Methioninkonzentrationen berücksichtigt und die Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Balken mit unterschiedlichen Signifikanzbuchstaben unterscheiden sich auf einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$; CAT= Katalase, U= Units

12 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Eder bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie an der Justus-Liebig-Universität in Gießen meine Doktorarbeit anzufertigen und mir dieses Thema überlassen hat.

Ebenfalls ein großer Dank gilt Frau Dr. Johanna O. Zeitz, die mir während der gesamten Zeit hilfsbereit und engagiert zur Seite stand und durch ihre fachliche Betreuung sehr zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen hat.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern sowie Doktoranden des Instituts bedanken, die an dieser Arbeit beteiligt waren. Vielen Dank für die Planung und Betreuung des Versuchs, die zahlreichen Probennahmen und vor allem die tatkräftige Unterstützung bei den Laboranalysen.

Ich danke meinen Freunden, die immer für mich da sind, ein offenes Ohr haben, mir mit Rat und Tat zur Seite stehen und dafür, dass ihr stets die richtigen Worte finden.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich immer geduldig und bedingungslos unterstützt hat und mir somit das Studium der Veterinärmedizin und diese Doktorarbeit erst ermöglicht haben.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6770-0

